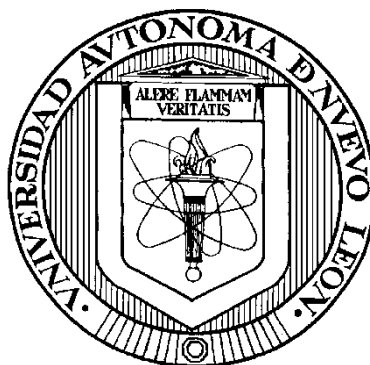


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



Análisis de la expresión de genes relacionados a metabolismo y sus implicaciones en el cáncer de mama.

Por

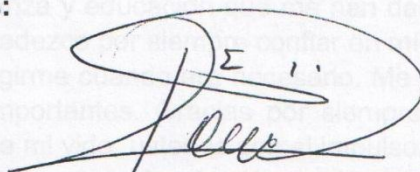
L.B.G. CLAUDIA DANIELA AGUAYO MILLÁN

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería
Genética.**

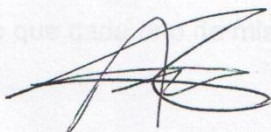
OCTUBRE / 2016

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS A METABOLISMO
Y SUS IMPLICACIONES EN CÁNCER DE MAMA.**

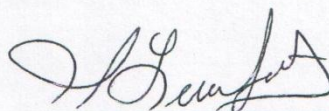
Aprobación de la Tesis:



Dra. C. Rocío Ortiz López
Directora de Tesis



Dr. C. Alberto Camacho Morales
Co-Director de Tesis



Dra. C. Lizeth Alicia Fuentes Mera
Miembro de Tesis



Dra. med. Raquel Garza Guajardo
Subdirectora de Estudios de Posgrado

Dedicatoria

A

mis padres, todo esto es gracias a ustedes ya que sin la vida, confianza y educación que me han dado yo no sería quien soy el día de hoy. Les agradezco por siempre confiar en mí, por haberme dado todo su amor y saber corregirme cuando era necesario. Me han enseñado a valorar las cosas realmente importantes. Gracias por siempre estar presentes, en cada momento y etapa de mi vida, ustedes son el impulso que siempre he necesitado para lograr mis metas, son mi inspiración y mis ganas de crecer cada vez más. Les debo mucho.

Recuerden siempre que cada uno de mis logros es suyo también. Los amo.

Agradecimientos

A **Dios** por mi vida, salud y las circunstancias. Gracias por llevarme siempre de tu mano, sé que tus planes para mí son mejores que los míos.

A mi **familia** por siempre estar presente, por apoyarme en mis sueños, impulsarme e inspirarme siempre a crecer, ustedes son mi fuerza. Los amo.

A **Daniel** mi chico favorito, por resistir con paciencia la increíble travesía que es estar conmigo. Gracias por tu amor, tu compañía y tu apoyo incondicional.

A mi comisión de tesis, **Dra. Rocío** le agradezco haberme permitido formar parte de su grupo de investigación, por preocuparse por mi crecimiento académico y personal, le guardaré siempre mucho respeto y admiración. **Dr. Camacho** y **Dra. Liz** les agradezco su apoyo y consejos desde el inicio de este proyecto.

Al **Dr. Cabrera** y **Dr. Treviño**, les agradezco su ayuda en la interpretación de los resultados obtenidos en este trabajo.

A mis nuevas familias:

A la **Unidad de Genómica**, Ernesto, Pepe, Liz, Grecia, Adriana, Carlos y Laura: gracias chicos por hacer de la ciencia algo muy divertido y por toda su ayuda y auxilio en mis momentos de crisis. De forma especial a Yadira, Sandra, Maribel y Geo: gracias por tenerme tanta paciencia, por sus enseñanzas y por guiarme desde el inicio hasta el final de este proyecto.

A la **Unidad de Terapia Génica**, ustedes fueron mi primer hogar en el CIDICS y les estaré siempre muy agradecida. Gracias por siempre estar dispuestos a apoyarme con cualquier cosa. Dr. Augusto, Dr. Iván, Fatí, Selem, Nidia, Nancy, Cecy, Sergio, Giss... los quiero mucho.

A mis **compañeros de maestría**, gracias por aligerar la carga de estos 2 años. Elda, Sonia, Yolanda, Erick, Roque, Hector y Daniel, les agradezco por cada reunión y carne asada, por escuchar mis tragedias y compartir las suyas... cuadro chico, los llevaré siempre conmigo.

Al **personal administrativo**, Paty, Juanny, Ariadna y Juany les agradezco todo su apoyo, guía y ayuda durante mi posgrado.

A las **pacientes**, a cada mujer que donó sus muestras aún con el miedo e impotencia por su condición de salud, gracias.

A **CONACyT** por el apoyo económico sin el cual no hubiera sido posible realizar mi maestría ni el proyecto de tesis.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN: CÁNCER DE MAMA.....	1
1.1 Epidemiología del CM	1
1.2 Anatomía de la glándula mamaria y cáncer.....	2
1.3 Factores de riesgo para CM	4
1.4 Diagnóstico del CM	6
1.5 Subtipos de cáncer de mama.....	8
1.6 Tratamiento del CM	10
2. CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO	12
2.1 Obesidad y CMTN	13
2.2 Metabolismo celular en CMTN	21
2.3 Búsqueda de biomarcadores en CMTN	25
3. JUSTIFICACIÓN	33
4. OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo General	34
4.2 Objetivos Específicos.	34
5. MATERIAL Y MÉTODOS	35
5.1 Materiales	35
5.2 Lugar donde se realizó el estudio.....	38
5.3 Estrategia general.....	39
5.4 Metodología experimental	40
6. RESULTADOS	48
6.1 Características generales de la población estudiada.....	48
6.2 Validación de métodos.....	50
6.3 Análisis de expresión en líneas celulares de cáncer de mama.....	52
6.4 Análisis de expresión en tejido sano de mama.....	57
6.5 Análisis de expresión en tejido tumoral de CMTN y CMnTN.....	58
6.6 Ensayo de inhibición de HMGA1 en las líneas celulares de CMTN	59
6.7 Análisis del efecto de la inhibición del gen HMGA1 en líneas celulares de CMTN por microarreglos de expresión.....	61
7. DISCUSIÓN.....	65
7.1 Diferencias de expresión en líneas celulares de cáncer de mama.....	65
7.2 Expresión en tejido tumoral de mama.	70
7.3 Efecto de la inhibición de HMGA1 en CMTN.	71
8. CONCLUSIONES.....	77
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

Índice de tablas

Tabla 1 Factores de riesgo modificables y no modificables para el CM.....	5
Tabla 2 Tratamiento y pronóstico en CM	12
Tabla 3 Clasificación de Lehmann de los subtipos de CMTN.	25
Tabla 4 Firmas genómicas obtenidas por análisis de perfiles de expresión en CMTN	26
Tabla 5 Listado de genes candidatos y las rutas metabólicas en las que participan .	32
Tabla 6 Condiciones de cultivo de las líneas celulares.	40
Tabla 7 Listado de primers utilizados	41
Tabla 8 Características de las líneas celulares	48
Tabla 9 Características clinicopatológicas de las pacientes	49
Tabla 10 Genes desregulados en HCC1395 por la inhibición de HMGA1.....	62
Tabla 11 Genes desregulados en MDA-231 por la inhibición de HMGA1	64

Índice de figuras

Fig. 1 Gráficas con los tipos de cáncer con mayor tasa de mortalidad y con mayor incidencia en mujeres en México	1
Fig. 2 Anatomía de la glándula mamaria.....	3
Fig. 3 Tipos de cáncer de mama	4
Fig. 4 Clasificación molecular del CM	9
Fig. 5 Esquema ruta metabólica de la insulina	15
Fig. 6 “Heatmap” de los análisis de expresión global en tumores (Datos no publicados).....	29
Fig. 7 Red de interacción de los genes de la firma con genes de metabolismo	31
Fig. 8 Diseño experimental de la placa para el ensayo de inhibición de HMGA1	45
Fig. 9 Gel de agarosa al 2% de PCR punto final en gradiente de temperatura.....	50
Fig. 10 Curvas de amplificación, curva melting y curva de eficiencia	51
Fig. 11 Prueba de estabilidad y eficiencia del gen endógeno	52
Fig. 12 Gráficas de expresión de IGF1R, ITPR1, PGC1 α , ACADM y ACOX1 en la línea celular BT483.....	53
Fig. 13 Gráficas de expresión de ACACA, FASN, CPT1A, SDHA e IGF1 en la línea celular BT474.....	54
Fig. 14 Gráficas de expresión de TFAM y COX4i1 en la línea celular HCC1395.....	55
Fig. 15 Gráficas de expresión de MFN2, ATF4, HSPA5, SCD y CHOP en la línea celular MDA-MB-231	56
Fig. 16 Gráficas de expresión de GLUT1, INS, IRS1 y LIPE en la línea celular MDA-MB-231	57
Fig. 17 Gráficas de expresión de los 21 genes en tejido sano de mama	58
Fig. 18 Diagrama de “cajas y bigotes” representando la expresión de COX4i1, GLUT1, INS, IRS1, LIPE y TFAM en las muestras de tumor.....	59
Fig. 19 Gráfica del porcentaje de inhibición de HMGA1 en la línea HCC1395.....	60
Fig. 20 Gráfica del porcentaje de inhibición de HMGA1 en la línea MDA-231	60
Fig. 21 “Heatmap” de la línea HCC1395 con (-HMGA1) y sin (+HMGA1) la inhibición de HMGA1	61
Fig. 22 Heatmap de la línea MDA-231 con (-HMGA1) y sin (+HMGA1) la inhibición de HMGA1	63
Fig. 23 Perfil de expresión diferencial en las líneas de CMTN	67
Fig. 24 Esquema de la integración de los mecanismos regulados por HMGA1	76

Lista de abreviaturas

aRNA	Ácido ribonucleico amplificado
ATP	Adenosín trifosfato
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CK's	Citoqueratinas
CM	Cáncer de mama
CMnTN	Cáncer de mama no triple negativo
CMTN	Cáncer de mama triple negativo
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico 2
IGF1	Factor de crecimiento tipo insulina
iRNA	Ácido ribonucleico de interferencia
mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PPAR's	Receptores activadores de proliferación de peroxisomas
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RE	Receptor de estrógenos
Rend	Retículo endoplásmico
RMA	Roboust multi-array average
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RP	Receptor de progesterona
siRNA	RNA de silenciamiento
TEM	Transición epitelio-mesenquimal

RESUMEN

L.B.G. Claudia Daniela Aguayo Millán Fecha de disertación: octubre, 2016.

**Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina.
Candidata para obtener el grado de Maestro en Ciencias con orientación en
Biología Molecular e Ingeniería Genética.**

Título: “Análisis de la expresión de genes asociados a metabolismo y sus implicaciones en cáncer de mama”.

Introducción: La principal causa de muerte por cáncer en mujeres es el cáncer de mama (CM) en donde la obesidad es uno de los principales factores de riesgo para padecer esta enfermedad, sugiriendo que alteraciones en el perfil metabólico representan un evento importante en esta patología. **Objetivo:** Analizar la expresión de un grupo de genes relacionados al metabolismo y entender sus implicaciones en el CM. **Métodos:** a) En una primera etapa, se realizó un análisis de expresión por qPCR con SybrGreen de 21 genes candidatos importantes para el metabolismo celular. Se utilizaron 7 líneas celulares de distintos subtipos de CM (luminales, basales y HER2+). Después del primer tamizaje se seleccionaron 6 genes diferencialmente expresados entre el grupo de líneas de cáncer de mama triple negativo (CMTN) versus las de cáncer de mama no triple negativo (CMnTN). Los 6 genes seleccionados se analizaron en 33 biopsias tumorales: 17 de CMTN y 16 de CMnTN por qPCR con SybrGreen. Los análisis se realizaron empleando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. b) En una segunda etapa se realizó la inhibición del gen *HMGA1* (codifica una proteína remodeladora de cromatina, participa en la regulación de la transcripción y la progresión metastásica de las células cancerosas). La inhibición se realizó mediante iRNA en 2 líneas celulares de CMTN que sobreexpresan *HMGA1*: HCC1395 derivada de tumor primario y MDA-231 derivada de tumor metastásico. Se realizó el análisis de expresión global para evaluar el efecto de la inhibición mediante microarreglos de expresión. **Resultados:** a) En el estudio de genes candidatos en líneas celulares se observó una sobreexpresión significativa de los genes *INS*, *IRS1*, *GLUT1* y *LIPE* en MDA-231 y *TFAM* y *COX4i1* en HCC1395 (CMTN) (T-test, $p < 0.01$ y $p < 0.0001$, respectivamente) en comparación con los demás subtipos de CM. Se observó también que estos genes permiten diferenciar entre 2 estadios de la enfermedad (tumor primario versus metástasis). El análisis de estos 6 genes en las muestras de tumor de CM no mostró diferencias significativas entre ambos grupos de estudio (KS-test, $p < 0.01$ y $p < 0.05$). b) La inhibición del gen *HMGA1* en la línea de tumor primario resultó en la sobreexpresión de 14 genes y subexpresión de 3 genes, en general relacionados con matriz celular, inflamación y proliferación celular. La inhibición de *HMGA1* en la línea metastásica mostró la subexpresión de 6 genes relacionados con la regulación y organización del citoesqueleto y la sobreexpresión de un gen, *PRRX1*, asociado a la transición epitelio-mesenquimal (TEM). **Conclusiones:** En líneas celulares se identificaron patrones de expresión selectivos de genes implicados en el metabolismo de lípidos para los subtipos luminales y de metabolismo de carbohidratos y mitocondriales para el subtipo de CMTN. Se observó la sobreexpresión de 6 genes que permiten diferenciar entre tumor primario y metástasis en CMTN. No se observaron diferencias de expresión de los 6 genes seleccionados en las biopsias de tumor de CM. Los genes afectados por el silenciamiento de *HMGA1* están directamente relacionados con la regulación y organización del citoesqueleto y también con la TEM. **Contribuciones:** Identificación de firma de 6 genes que permiten diferenciar entre estadio de tumor primario y metástasis en líneas celulares, nunca antes descrito para CMTN. El efecto inhibitorio de *HMGA1* sobre *PRRX1*. Debido a que no se ha reportado una firma de genes que diferencien estadios de la enfermedad en CMTN ni se ha relacionado el papel de *HMGA1* en la regulación de la inhibición de *PRRX1* para promover la TEM, estos hallazgos son de suma importancia para entender los mecanismos que confieren la agresividad y capacidad metastásica que se observa en el CMTN.

Dra. en C. Rocío Ortíz López
Director de Tesis

1. INTRODUCCIÓN: CÁNCER DE MAMA.

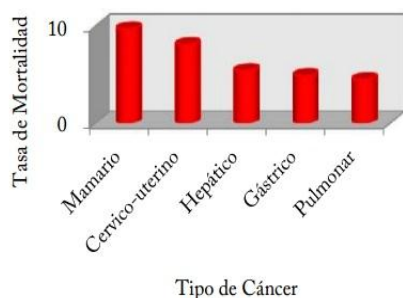
1.1 Epidemiología del CM.

El cáncer de mama (CM) es el tipo de cáncer más común y es una de las causas principales de mortalidad por cáncer en mujeres alrededor del mundo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada año se detectan 1.38 millones de nuevos casos y fallecen 458 mil personas por esta causa¹.

Actualmente la incidencia de este tipo de cáncer es similar en países desarrollados y en desarrollo, pero la mayoría de las muertes se dan en países de bajos ingresos, esto posiblemente a diferencias en el acceso a la atención médica y tratamiento o bien a que el diagnóstico se realiza en etapas muy avanzadas de la enfermedad².

En México el CM es el tipo de cáncer más frecuente en mujeres y el que presenta la mayor tasa de mortalidad, seguido por el cáncer cervico-uterino³ (Fig.1).

GRÁFICA 11. TIPOS DE CÁNCER CON MAYOR TASA DE MORTALIDAD EN EL SEXO FEMENINO, MÉXICO 2012



FUENTE: GLOBOCAN, 2012

GRÁFICA 14. TASAS DE INCIDENCIA DE LOS TIPOS DE CÁNCER MÁS FRECUENTES EN EL SEXO FEMENINO, MÉXICO 2012

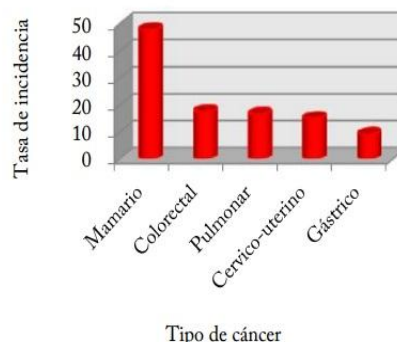


Fig. 1 Gráficas con los tipos de cáncer con mayor tasa de mortalidad y con mayor incidencia en mujeres en México.

El CM es la principal neoplasia que presenta la población femenina mexicana de 20 años y más (30.9%). En 2012, de cada 100 fallecimientos por tumores malignos en mujeres de 20 años y más, quince fueron por CM. La morbilidad de esta enfermedad es mayor entre mujeres de 40 a 60 años, observándose que el mayor porcentaje de casos (29.8%) se encuentra entre las mujeres de 50 a 59 años, y el segundo más alto (27.8%) entre mujeres de 40 a 49 años², indicando que la presencia de casos en mujeres jóvenes es de importancia en nuestra población.

Para el año 2030, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) estima más de 596,000 casos nuevos y más de 142,100 muertes en la región, principalmente en la zona de América Latina y el Caribe ².

La muerte en pacientes jóvenes por CM en México es indicativo de una creciente frecuencia de casos agresivos de esta enfermedad y/o con poca o nula respuesta al tratamiento. Esto refleja la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de tratamiento, así como la búsqueda de biomarcadores que ayuden a individualizar las condiciones de las pacientes, el grado de la enfermedad y las opciones de terapias personalizadas para las mujeres mexicanas.

1.2 Anatomía de la glándula mamaria y cáncer.

La mama está compuesta de glándulas llamadas lobulillos donde se lleva a cabo la producción de leche y por tubos delgados denominados conductos que transportan la leche desde los lóbulos al pezón. El tejido mamario también contiene grasa y tejido conectivo, ganglios linfáticos y vasos sanguíneos⁴ (Figura 2).

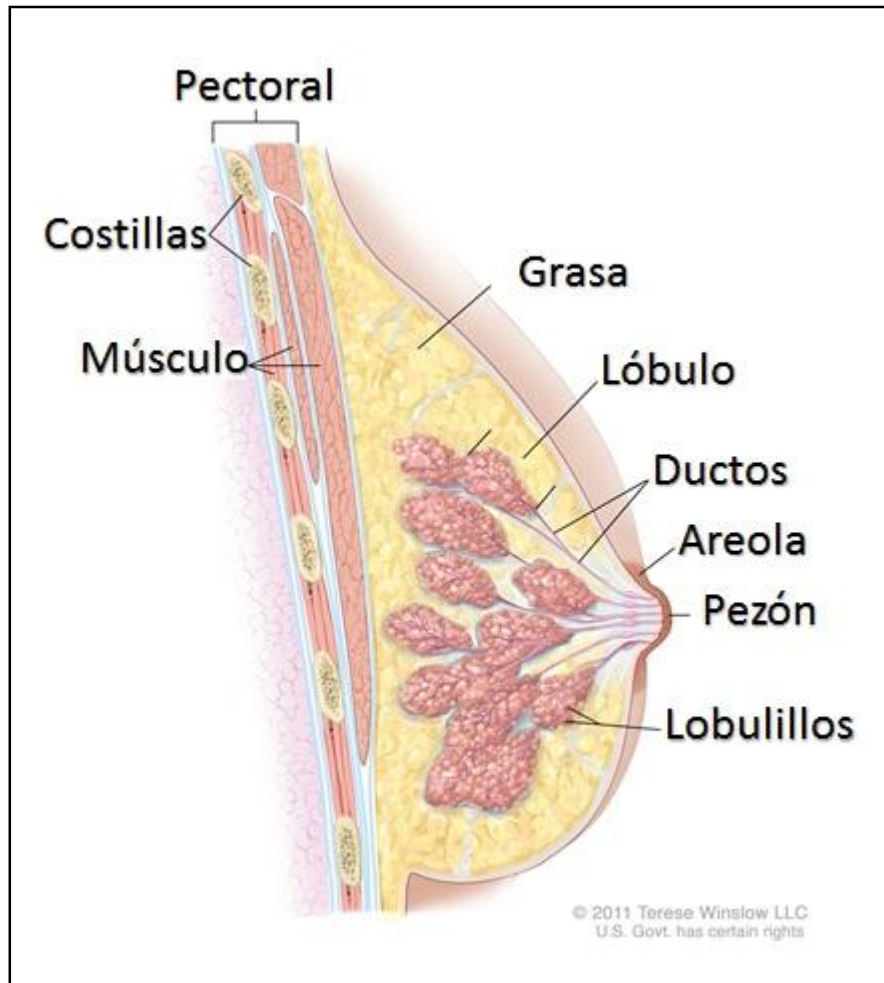


Fig. 2 Anatomía de la glándula mamaria.⁵

El CM es una proliferación anormal maligna de las células epiteliales que revisten a los conductos o a los lobulillos mamarios. El tipo más común es el carcinoma ductal, el cual se origina en las células de los conductos. Sin embargo, el CM también puede comenzar en otros tejidos de la mama como los lobulillos (carcinoma lobulillar) ⁶ o a partir de células anómalas que “flotan” en acumulaciones de mucina (carcinoma mucinoso)⁴, ver figura 3. Se denomina CM invasivo cuando las células cancerosas se han desplazado de los ductos o lobulillos al tejido adyacente⁴.

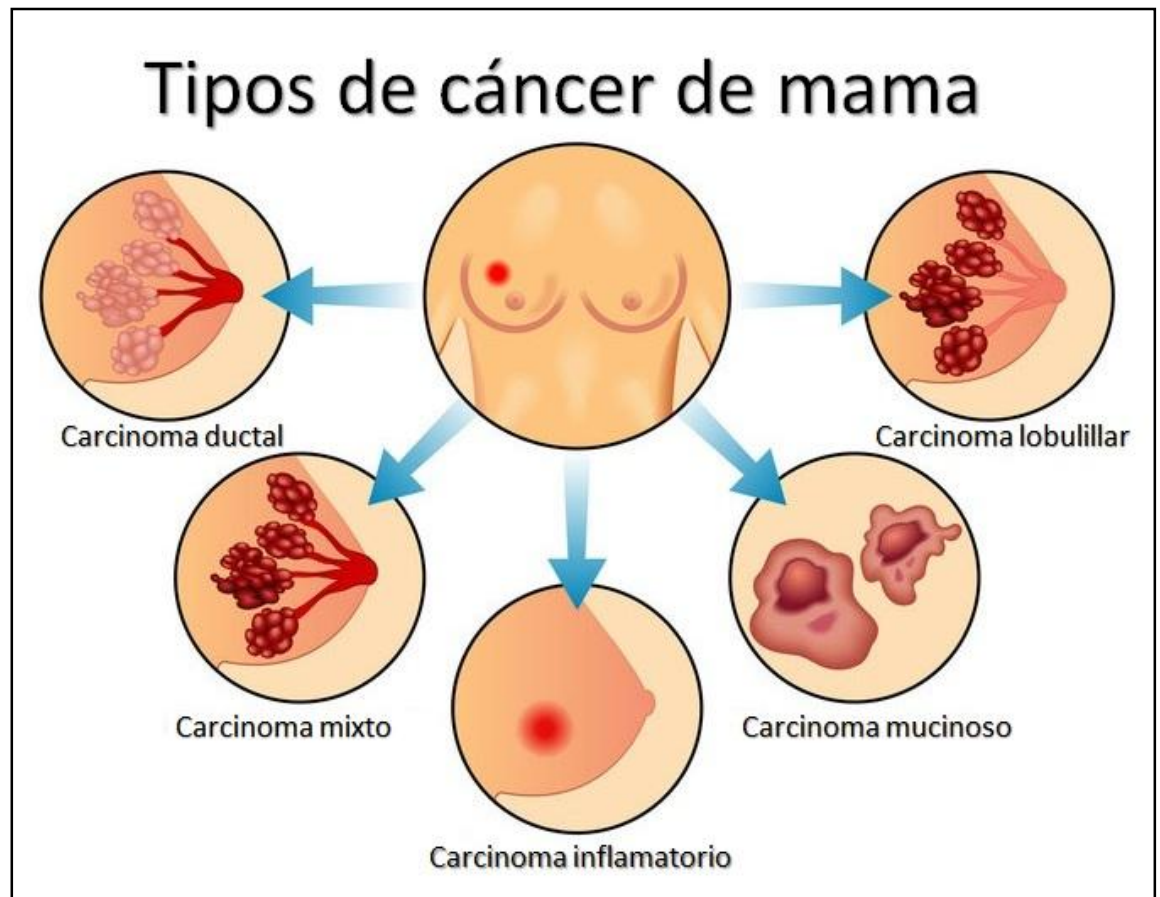


Fig. 3 Tipos de cáncer de mama. Esquema representativo de los tipos de CM descritos con base al sitio específico de origen en la mama.

1.3 Factores de riesgo para CM.

Factores genéticos: Algunas mutaciones, en especial en los genes *BRCA1*, *BRCA2* y *TP53*, se asocian a un riesgo elevado de padecer este tipo de cáncer (OR 1.15, IC 75% 1.03-1.28)⁷.

Factores hormonales o gineco-obstétricos: La exposición prolongada a estrógenos endógenos, como en los casos de una menarquía precoz o una menopausia tardía así como tener el primer parto en edades avanzadas, figuran entre los factores de riesgo más importantes del CM⁸. Las hormonas exógenas como el uso de anticonceptivos orales y tratamientos de remplazo hormonal por

periodos prolongados (mayor de cinco años) incrementan en 2% anual el riesgo de padecer CM⁹. El embarazo y la lactancia reducen la cantidad total de ciclos menstruales en la vida de la mujer, y se ha observado que pueden reducir el riesgo de padecer CM en el futuro¹⁰ (OR 0.39, IC 95% 0.25-0.62)¹¹.

Factores ambientales: En estudios se ha reportado que el 21% de todas las muertes por CM registradas en el mundo son atribuibles al consumo de alcohol, el sobrepeso u obesidad, y la falta de actividad física. Esa proporción fue mayor en los países de ingresos altos (27%), siendo los factores más importantes el sobrepeso y la obesidad. En los países de ingresos bajos y medios, la proporción de CM atribuibles a esos factores de riesgo fue del 18%, y la falta de actividad física fue el factor determinante más importante (10%)¹². A pesar de que la etiología de esta neoplasia es claramente multifactorial, existe fuerte evidencia de la influencia de factores ambientales, siendo la dieta uno de los más importantes. Algunos de los factores de riesgo se resumen en la tabla 1:

Tabla 1 Factores de riesgo modificables y no modificables para el CM.

Factores de riesgo que no pueden modificarse	Factores de riesgo modificables
Edad avanzada	Factores reproductivos
Sexo (femenino)	Paridad
Edad temprana de 1era menarca	No amamantar
Edad avanzada en menopausia	Obesidad
Nuliparidad	Consumo de alcohol
Antecedentes familiares de CM	Tabaquismo
Raza, etnia	Falta de actividad física

1.4 Diagnóstico del CM.

El diagnóstico clínico del CM generalmente se realiza después de que aparecen los síntomas, ya que en su mayoría, las mujeres con CM en etapa inicial no presentan síntomas. Debido a esto se recomienda la autoexploración mensual de las mamas para detectar la presencia de cualquier protuberancia o bulto interno o también señales anormales como la retracción o erosión del pezón, enrojecimiento generalizado de la glándula mamaria, crecimiento de venas o aparición de huecos en las mamas¹³.

La confirmación de un presunto diagnóstico de CM utiliza pruebas que se realizan de manera rutinaria como la mamografía o resonancia magnética con la finalidad de observar con mayor detalle la estructura anormal de la mama. Si se observa la presencia de un cuerpo anormal se procede a obtener una biopsia la cual es analizada por un patólogo mediante técnicas de microscopía donde se verifica si existen signos de cáncer, para entonces confirmar el diagnóstico clínico mediante el análisis histopatológico. Hay cuatro tipos de biopsias que se utilizan para examinar el CM, biopsia por escisión que es la extracción completa de una masa de tejido, biopsia por incisión que consiste en la extracción de una parte del tejido, biopsia con aguja gruesa y biopsia por aspiración con aguja fina donde puede extraerse tejido o líquido¹⁴.

En la actualidad, el diagnóstico histopatológico del CM se complementa con el análisis por inmunohistoquímica para evaluar el estado de los receptores de estrógeno (RE), de progesterona (RP), el receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2) y el marcador Ki-67. El Ki-67 es un antígeno nuclear

presente en las fases G1, S, G2 y mitosis pero está ausente en las células en fase G0, lo que lo convierte en un excelente marcador para determinar la fracción de células en proliferación activa¹⁵.

Los receptores de hormonas esteroidales, principalmente el RE y el RP, han sido utilizados y estudiados ampliamente como indicadores de pronóstico y son de gran importancia clínica ya que se relaciona con el hecho de que su presencia identifica tumores que son sensibles al tratamiento hormonal con el antagonista correspondiente. Es debido a esto que se ha podido observar en pacientes con tumores que expresan RE una mayor sobrevida, un período mayor libre de enfermedad y una mayor sobrevida en caso de recaída cuando se les compara con pacientes negativas para este receptor. Los tumores positivos para este receptor presentan características histopatológicas de bajo grado¹⁶.

El producto del gen *ERBB2* es un receptor glicoprotéico transmembranal al que se le ha denominado HER-2, es un componente de las células epidérmicas normales y está patológicamente incrementado en una variedad de cánceres, especialmente en CM. Estos tumores presentan un mayor crecimiento celular y producen metástasis con mayor rapidez que los tumores HER-2 negativos. No se ha encontrado sobreexpresión en carcinomas lobulillares pero si se encuentra en la forma *in situ* de los carcinomas ductales. La sobreexpresión del gen está relacionada con un mal pronóstico en grupos de pacientes con metástasis axilares, en los que se ha observado resistencia a la quimioterapia combinada y con resistencia a la terapia hormonal¹⁷.

1.5 Subtipos de cáncer de mama.

Gracias a los avances en el análisis por inmunohistoquímica se ha clasificado al CM en 4 subtipos distintos: 1) Luminal A aquellos tumores que sean positivos para RE y/o RP, negativos a HER2 y con un Ki-67 <14%, 2) Luminal B aquellos tumores que sean positivos a RE y RP, negativos a HER2 y con un Ki-67 >14%; se determinó que un punto de corte del Ki-67 de 14% puede discriminar entre los subtipos Luminal A y B¹⁸; 3) HER2-positivo a los tumores negativos a RE y RP y positivos al receptor HER2, y 4) Triple Negativo a los tumores negativos a los 3 receptores (RE-, RP- y HER2-). Cabe mencionar que esta clasificación histopatológica de los tumores de mama ha ido evolucionando en gran parte debido a los estudios moleculares mediante tecnologías genómicas como microarreglos de expresión que han mostrado que los carcinomas de mama representan un grupo de tumores con un comportamiento biológico muy diverso y una gran variabilidad clínica. Estudios pioneros como el de Perou¹⁹ han permitido clasificar al CM en cinco subtipos moleculares: Luminal A, Luminal B, HER2-positivo, Basal-like y Normal-like¹⁹. De forma más reciente se ha identificado un nuevo subtipo clasificado como “Bajo en Claudina” (Figura 4), el cual se caracteriza por una baja o nula expresión de marcadores de diferenciación luminal, alta expresión de genes involucrados en la transición epitelio-mesenquimal (TEM), genes de respuesta inmune y características similares a células madre²⁰.

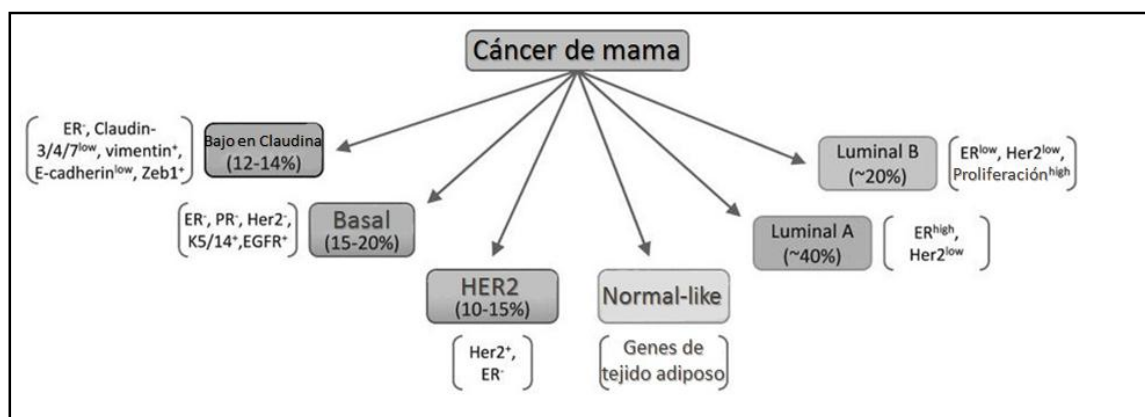


Fig. 4 Clasificación molecular del CM.²¹

El subtipo Luminal A es el más frecuente, correspondiendo al 67% de los tumores, posee alta expresión de genes relacionados con los receptores hormonales y baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular²². El subtipo Luminal B presenta niveles menores de RE en comparación con el subtipo Luminal A y altos niveles de expresión de genes de proliferación. Los carcinomas mamarios tipo luminal son los subtipos de mejor pronóstico y se caracterizan por expresar el gen del RE, genes asociados como LIV1 y ciclina D1 y citoqueratinas de bajo peso molecular CK7, CK8, CK18, de forma semejante al epitelio luminal de los conductos mamarios²³.

El carcinoma de mama HER2-positivo muestra una elevada expresión de genes asociados a *ERBB2* y suele asociarse a otros marcadores de mal pronóstico, incluyendo alteraciones de genes como topoisomerasa II alfa, GATA4, genes de angiogénesis y proteólisis. Aunque muestran una mejor respuesta a la quimioterapia, el pronóstico para quienes padecen este subtipo de cáncer es malo ²³.

El CM subtipo “Normal-like” comparte características del tejido mamario normal, muestra una alta expresión de genes normalmente expresados en el tejido adiposo y baja expresión de genes epiteliales luminales²³.

El carcinoma subtipo Basal se caracteriza por la sobreexpresión de citoqueratinas que son características de la capa basal como CK5/6 y CK17 y por la expresión de genes relacionados con proliferación celular. Además estos tumores presentan una tasa más alta de mutaciones en el gen *TP53* y *BRCA1*, sobreexpresión de EGFR y se caracterizan por la ausencia de expresión de genes relacionados al gen del RE y de HER2. Dentro de este subtipo se incluye al CM triple negativo (CMTN)²³ del cual se hablará más adelante.

1.6 Tratamiento del CM.

El tratamiento disponible para las pacientes con CM se basa en distintos factores que incluyen el tipo y estadio del tumor y el estado de RE, RP y HER2¹⁴.

Uno de los tratamientos más utilizados es el quirúrgico, La mayoría de las pacientes de CM se someten a cirugía a fin de extirpar los tumores. Se utilizan variantes de dos procedimientos principales, la mastectomía parcial o cirugía para conservar la mama es una operación en la que se extirpa el tumor y parte del tejido que lo rodea, pero no la mama completa, y la mastectomía radical que consiste en extirpar toda la mama con cáncer. Se pueden extirpar algunos ganglios linfáticos axilares para someterlos a evaluación en caso de que se sospeche de la diseminación de las células cancerosas¹⁴.

La terapia hormonal es administrada en aquellas pacientes con tumores positivos a receptores de hormonas. El fármaco más utilizado para la terapia hormonal es el tamoxifeno debido a que bloquea la actividad del estrógeno en el cuerpo. El tamoxifeno ayuda a prevenir la recurrencia del cáncer original y la formación de nuevos cánceres en el seno opuesto²⁴ y se puede administrar a mujeres tanto premenopáusicas como posmenopáusicas.

Es posible que las mujeres posmenopáusicas reciban terapia hormonal con otro fármaco como el inhibidor de aromatasa. Este fármaco puede administrarse en lugar del tratamiento con el tamoxifeno o después de éste. En vez de bloquear la actividad del estrógeno, como lo hace el tamoxifeno, los inhibidores de aromatasa impiden que el cuerpo produzca estrógeno²⁵.

El tratamiento tradicional para los carcinomas HER2-positivos es el trastuzumab (nombre comercial Herceptin®), el cual es un anticuerpo monoclonal dirigido a los receptores HER2 en la superficie de las células cancerosas impidiendo la señalización para la proliferación celular. Mediante el bloqueo se puede disminuir o incluso interrumpir el crecimiento del tumor²⁵.

Para el CMTN, debido a que carece de los receptores para los cuales ya existen terapias dirigidas, generalmente se administra una combinación de terapias como cirugía, quimioterapia y terapia radiológica. Este subtipo de cáncer presenta una buena respuesta a la quimioterapia, sin embargo se ha observado recurrencia en una forma más agresiva presentando resistencia a esta, por lo que el CMTN constituye un desafío debido a las limitaciones en su tratamiento²⁶. El pronóstico y tratamiento para cada subtipo de CM se resume en la Tabla 2:

Tabla 2 Tratamiento y pronóstico en CM.

Subtipo	Grado histológico	Inmunoperfil	Pronóstico	Respuesta a tratamiento
Luminal A	1 a 2	RE/RP+++, HER2-, Ki67 bajo	Bueno	Hormonal (no responde a quimioterapia)
Luminal B	2 a 3	RE/RP+, HER2-/+, Ki67 alto	Intermedio	Quimioterapia
HER2+	2 a 3	RE/RP-, HER2+, Ki67 alto	Malo	Herceptin®, quimioterapia
CMTN	3	RE/RP-, HER2-, Ki67 alto, CK5/6+, EGFR+	Malo	Quimioterapia (no responde a terapia hormonal ni Herceptin®)

2. CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO

Mediante la clasificación por inmunohistoquímica, se ha observado que el CMTN se caracteriza por la falta de RE, RP y HER2. Basado en la clasificación molecular, este subtipo se encuentra dentro del grupo basal ya que su perfil genético es similar al de las células basales sin embargo, dentro del grupo de CMTN, solo el 70% representa tumores basaloideos verdaderos²⁷. La conducta biológica del CMTN suele ser más agresiva y con una mayor tendencia a presentar metástasis a distancia, comparada con los otros subtipos de CM, predominando las metástasis viscerales (hígado, pulmón) y en sistema nervioso central²⁸. Este subtipo está asociado a una muy baja sobrevida libre de enfermedad de aproximadamente 3 años, tiene un mal pronóstico, presenta un alto grado histológico, altos niveles de proliferación y necrosis^{23, 29}.

Cerca del 15-20% de todos los CM en E.U.A. son triple negativo, sin embargo se ha observado una mayor incidencia en mujeres en etapa premenopáusica y en mujeres africanas y latinoamericanas³⁰. Para el caso de Latinoamérica se han reportado frecuencias de 23.1% en México²⁸; 27% en Brasil; 24.6% en Venezuela y 21,3% en Perú³¹.

Es de importancia mencionar que los factores de riesgo para padecer CMTN difieren de los otros subtipos de CM. Contradictoriamente la gestación parece ser un factor de riesgo importante donde la multiparidad está asociada a un riesgo incrementado así como también se ha observado una mayor incidencia (OR, 1.68; 95% CI, 1.10–2.55)³² en mujeres premenopáusicas²⁸. Además, se ha observado que presentan un riesgo incrementado a tener este subtipo de CM las mujeres que padecen diabetes, hipertensión, obesidad y síndrome metabólico²⁶,
³³.

2.1 Obesidad y CMTN.

La obesidad es considerada la enfermedad más prevalente del mundo occidental y como una enfermedad crónica multifactorial compleja que se desarrolla por la interacción del genotipo y el medio ambiente. Es un problema de desequilibrio de nutrientes que se traduce en un mayor almacenamiento de alimentos en forma de grasa que los que son requeridos para satisfacer las necesidades energéticas y metabólicas del individuo³⁴.

La obesidad constituye un factor de riesgo importante para el desarrollo de ciertos tumores malignos como el adenocarcinoma de próstata y cáncer colorrectal en hombres y el de endometrio, ovario y mama en mujeres³⁴.

Se cree que los cambios endocrinos que ocurren en condiciones de obesidad podrían ser los causantes del incremento de la prevalencia de neoplasias mamarias en mujeres obesas. La relación entre la obesidad y los subtipos de CM positivo a receptores hormonales en las mujeres posmenopáusicas ya ha sido establecida y se debe al mecanismo de la conversión hormonal de las grasas periféricas a estrógeno por la enzima aromatasa²⁸. En mujeres obesas posmenopáusicas los niveles de estrógeno son un 50-100% más elevados que entre las mujeres posmenopáusicas con peso normal. Antes de la menopausia los ovarios son la fuente principal de estrógenos, sin embargo, después de la menopausia los ovarios dejan de producirlos por lo que el tejido adiposo se convierte en la principal fuente de esta hormona³⁵. En un estudio retrospectivo realizado por Haakinson y colaboradores, utilizando bases de datos de pacientes atendidas en un período de 8 años (2000-2008), se observó una correlación en mujeres obesas con la presencia de tumores mamarios más grandes y desarrollo de metástasis a nódulos linfáticos³⁶.

En la actualidad se desconoce cuáles son los factores que dan origen al desarrollo de cáncer en los subtipos triple negativo, sin embargo se han sugerido algunos mecanismos que se sabe están alterados en condiciones de obesidad que se cree pudieran estar contribuyendo al desarrollo neoplásico. Uno de estos mecanismos está regulado por la insulina y el factor de crecimiento tipo insulínico (IGF-1)³⁷.

Relación entre obesidad y CMTN: Insulina e IGF1.

La hiperinsulinemia es el cambio endocrino más frecuentemente observado en la obesidad. La insulina es una hormona involucrada en procesos de proliferación celular a través de la activación de dos vías principales de transducción de señales, la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K) y la proteína mitogénica MAPK (Figura 5). También esta hormona por si misma puede inducir la actividad de la enzima aromatasa sobre el tejido adiposo para producir estrógeno y promueve la invasión a otros tejidos³⁷.

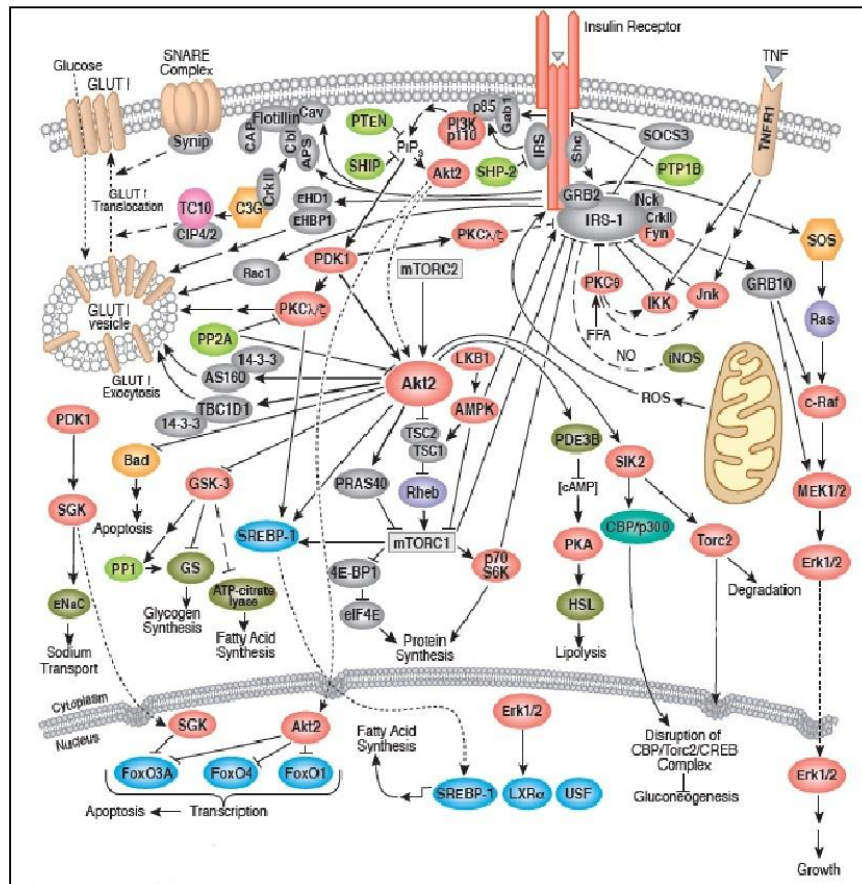


Fig. 5 Esquema ruta metabólica de la insulina. Al activarse el receptor de la insulina por alguno de sus sustratos activa, entre otras rutas, la vía de PI3K que fosforila a la proteína AKT la cual induce la translocación de GLUT1 a la membrana celular. Además, la insulina también activa a PDE3B que a su vez activa a HSL o LIPE para dar inicio a la lipólisis. Por otro lado, el receptor también activa la vía de RAS que conduce a proliferación celular³⁸.

La hiperinsulinemia también induce un incremento en la síntesis hepática del factor de crecimiento tipo insulínico (IGF-1) que es un factor de crecimiento endotelial, factor mitogénico y de crecimiento tumoral³⁹. La insulina inhibe directamente a IGFBP-1, su proteína de acoplamiento (que inhibe su actividad), aumentando los niveles de IGF-1 unidos al receptor promoviendo la proliferación celular⁴⁰.

La droga metformina ha mostrado acción como un potencial agente anti-cáncer⁴¹, es comúnmente utilizada para el tratamiento de la diabetes tipo 2 debido a su habilidad para reducir los niveles circulantes de glucosa e insulina. Los mecanismos propuestos involucran una acción directa (insulina-independiente) y una indirecta (insulina-dependiente). La acción indirecta de la metformina está asociada a la reducción en los niveles circulantes de insulina en los pacientes mediante la inhibición de la gluconeogénesis en el hígado y una incrementada captura de glucosa en el músculo. Debido a los efectos mitogénicos y antiapoptóticos de la insulina, la reducción de los niveles sistémicos de esta hormona explicarían los efectos anticancerígenos de la metformina⁴².

Los efectos directos de la metformina son atribuidos a la activación de AMPK la cual actúa como un sensor celular de energía y fosforila un gran número de componentes involucrados en la estimulación de rutas que generan ATP así como la inhibición de rutas que consumen ATP. La metformina activa la AMPK y se ha observado una subsecuente reducción de la señalización de mTOR

resultando por consecuencia una reducción de la síntesis de proteínas y proliferación celular^{42, 43}.

Obesidad y CMTN: Estrés de retículo endoplásmico y disfunción mitocondrial.

Otra posible relación entre el CMTN y la obesidad es consecuencia del desequilibrio energético crónico el cual produce hipertrofia e hiperplasia del adipocito, estrés del retículo endoplásmico y disfunción mitocondrial en diversos órganos metabólicamente relevantes en la homeostasis de energía. Este proceso favorece la producción y liberación sistémica de adipocinas, ácidos grasos libres y mediadores inflamatorios que causan mutaciones y daño celular^{44, 45}.

El retículo endoplásmico (REnd) es responsable de la síntesis de proteínas, la formación de gotas de lípidos y la detección y regulación de colesterol. También regula activamente el almacenamiento de lípidos, incluyendo la modulación de la absorción de ácidos grasos, almacenaje de ácidos grasos como triglicéridos y la agrupación de triglicéridos en gotas de lípidos que sirven para la síntesis de fosfolípidos.

En modelos de animales obesos se ha observado estrés del REnd, que es una condición celular presente cuando la función de este organelo es perturbada de manera que el correcto plegamiento y modificación de proteínas, formación de gotas lipídicas y/o disminución del metabolismo del colesterol. En condiciones de obesidad hay una excesiva demanda en el REnd y las manifestaciones de ésta condición incluyen el incremento en las concentraciones de lactato, la

producción de la proteína apoptótica CHOP y la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, por sus siglas en inglés)⁴⁶. Cuando hay exceso de nutrientes y/o insuficientes proteínas chaperonas, las proteínas plegadas anormalmente se agregan en el citosol y pueden interferir con las funciones celulares normales. La célula responde a la alteración de las vías de regulación para inhibir la síntesis de proteínas e incrementa la depuración de las proteínas plegadas anormalmente, sin embargo si el REnd y la homeostasis celular no son restauradas, UPR puede inducir apoptosis⁴⁷.

El estrés del REnd también puede resultar en la liberación sistémica de ácidos grasos libres y mediadores inflamatorios. Se ha demostrado que los ácidos grasos de cadena larga modulan la transcripción de genes involucrados en el metabolismo de lípidos⁴⁸, sin embargo existen muy pocas publicaciones sobre los efectos de los lípidos sobre la activación de genes y su relación con el cáncer. Un ejemplo que ilustra cómo los ácidos grasos de la dieta inducen la expresión génica es la interacción entre los ácidos grasos insaturados y la familia de factores transcripcionales denominados receptores activadores de proliferación de peroxisomas, también conocidos como PPARs.

Los PPARs funcionan como sensores lipídicos que regulan la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos y lipoproteínas, la homeostasis de la glucosa, la diferenciación y proliferación celular en adipocitos y la formación de células espumosas a partir de monocitos⁴⁹. El sistema PPAR cumple un papel importante en la regulación de vías metabólicas relacionadas con el balance energético, asimismo, participa en la producción de citoquinas involucradas en el

proceso inflamatorio, en el control del crecimiento-diferenciación celular normal (adipogénesis, desarrollo de macrófagos) y también, en la proliferación celular neoplásica ⁵⁰.

La unión del ligando a PPAR resulta en la activación de éste como factor transcripcional. El receptor dimeriza, formando un heterodímero con el receptor del ácido 9-cis retinoico y una vez activado se une a secuencias de DNA específicas llamadas “PPRE” (PPAR response element, o elemento de respuesta a proliferadores peroxisomales), presentes en los genes bajo control⁴⁹. Existen diversos subtipos de PPAR incluidos el α (alpha), β/δ (beta/delta) y el γ (gamma).

PPAR α modula la expresión constitutiva de genes que codifican enzimas mitocondriales del catabolismo de ácidos grasos y además, media la inducción de las enzimas de β -oxidación mitocondrial y peroxisomal de ácidos grasos, también regula la expresión de genes de la síntesis y transporte de colesterol, aparte de aquellos involucrados en la β - y ω -oxidación de lípidos ⁵¹.

Además de los efectos en el REnd, la obesidad se ha asociado con el estrés oxidativo a nivel mitocondrial, el cual se define como el desequilibrio en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) contra la reducción de sustancias que protegen contra el daño de los radicales libres y peróxidos. En condiciones de obesidad, el procesamiento del exceso de ácidos grasos libres por la mitocondria produce desacoplamiento mitocondrial y liberación de ROS. El exceso crónico de la producción de ROS puede producir disfunción mitocondrial en el hígado y músculo esquelético, lo cual causa acumulación de lípidos en esos

tejidos. Por otra parte, la generación de ROS por la mitocondria puede contribuir al desarrollo de cáncer y a una amplificación del fenotipo tumoral⁵².

Una generación excesiva de ROS, o una falla en el sistema antioxidante celular, puede interrumpir el correcto funcionamiento de la célula al oxidar lípidos, proteínas y DNA. Algunos oxidantes actúan como mensajeros en la transducción de señales por lo que tienen un papel importante en la regulación de la función celular, incluyendo la proliferación⁵².

Se ha observado que el incremento en la generación de ROS en el microambiente hipóxico del tumor representa un mecanismo importante para promover el crecimiento, reprogramación metabólica y supervivencia de las células tumorales, ya que estos oxidantes pueden actuar como moléculas señalizadoras y también causando un daño directo al DNA. A diferencia del DNA nuclear, el mtDNA (ADN mitocondrial) no se encuentra protegido por las histonas, por lo que la generación de ROS en la matriz puede dañarlo y la capacidad de reparación es limitada ⁵².

Existe evidencia del papel que juegan las mutaciones del mtDNA en cáncer gracias a estudios con cíbridos, los cuales son células viables que resultan de la fusión de un citoplasto (citoplasma después de remover el núcleo de una célula). Shidara y colaboradores realizaron un ensayo donde se utilizó cíbridos conteniendo mutaciones en la subunidad mitocondrial VI ATP sintasa, T8993G y T9176C (decrecen su actividad), y observaron que estas mutaciones confirieron un incremento en la proliferación y resistencia a la apoptosis en las células cuando se inocularon en ratones atímicos. Mutaciones que disminuyen pero no

eliminan la actividad del complejo IV pueden alterar la función de los acarreadores de electrones en la cadena transportadora incrementando la probabilidad de la generación de superóxido por los complejos I, II y III. Las ROS generadas por este cambio afectan la señalización reducción-oxidación involucrada en la regulación de la proliferación, por lo que se incrementa la tasa de crecimiento celular⁵³.

2.2 Metabolismo celular en CMTN.

En el año 2000, Hanahan y Weinberg definieron las características o “Hallmarks” del cáncer que comprenden 6 características biológicas adquiridas por las células durante el desarrollo de los tumores y funcionan como una manera de organizar la complejidad de las enfermedades neoplásicas. Estas características incluyen la señalización de proliferación sostenida, evasión de la supresión de crecimiento, resistencia a la apoptosis, inmortalidad celular, angiogénesis y metástasis⁵⁴. Recientemente, en el año 2011 se añadieron 2 “Hallmarks” nuevos: evasión del sistema inmune y reprogramación del metabolismo energético celular⁵⁵.

Las células cancerosas presentan en general un metabolismo celular alterado que se ha asociado a la tumorigénesis y progresión a la malignidad. Además del “Efecto Warburg”, donde las células cancerosas realizan glicólisis anaerobia aún en presencia de oxígeno para producir metabolitos de alta energía, nuevas alteraciones en el metabolismo en cáncer están siendo descritas. Kim Lee y colaboradores determinaron la expresión de proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos en tumores mamarios y su significancia

clínica. Analizaron en 476 muestras de tejido tumoral mamario embebido en parafina la expresión de las proteínas HSL, PLIN1, FABP4, CPT1A, ACOX-1 y FASN por inmunohistoquímica y observaron una expresión diferencial de las proteínas analizadas en los distintos subtipos de CM presentando una mayor expresión en el subtipo HER2-positivo. Realizaron posteriormente una correlación entre la expresión de estas proteínas y la sobrevida total y libre de enfermedad de estas pacientes observando que la positividad de ACOX1 en general se asocia a una menor sobrevida total, sin embargo cuando el subtipo tumoral fue considerado, la positividad de FABP4 en los tumores se asoció significativamente a una menor sobrevida total y menor sobrevida libre de enfermedad en pacientes con CMTN⁵⁶.

De forma similar, Powell analizó la expresión de la proteína de unión a ácidos grasos 5 (FABP5) en muestras de tejido tumoral mamario de 423 pacientes y observó que la expresión de esta proteína se correlaciona con CMTN, tumores de alto grado y una peor sobrevida libre de enfermedad así como también con EGFR. La inhibición de FABP5 en la línea celular murina E0771 de CM metastásico inhibió la migración y la capacidad de invasión de estas células⁵⁷.

Se han observado una gran cantidad de tumores que expresan altos niveles de la sintasa de ácidos grasos (FASN) incluyendo CM, cáncer colorrectal y cáncer de endometrio. Se ha realizado la inhibición de esta proteína en trabajos independientes ya reportados como el de Kridel⁵⁸ y el de Vazquez⁵⁹ donde se observó una reducción de células tumorales y también el incremento de la

sensibilización de estas células a terapias como al 5-fluoroacil y al trastuzumab (Herceptin®), respectivamente.

Descrito brevemente, los ácidos grasos endógenos son sintetizados a partir de citrato y NADPH del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), una vez en el citosol el citrato se convierte en acetil-CoA y oxaloacetato por la enzima ACL. La síntesis de ácidos grasos comienza con la acetil-CoA carboxilasa (ACC) convirtiendo acetil-CoA a malonil-CoA y posteriormente son convertidos a palmitato por FASN. Con base en los resultados observados en los trabajos de Kridel y Vazquez sería interesante investigar el efecto de la inhibición de otras enzimas en el metabolismo de lípidos, como ACL, ACC, SDH o ACACA sobre el desarrollo de proliferación y metástasis. Lo anterior podría constituir nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de algunos tipos de cáncer.

Por otro lado, también se han realizado investigaciones sobre el metabolismo de carbohidratos ya que se sabe que un incremento en la glicólisis permite la división de intermediarios en varias rutas biosintéticas, incluyendo la generación de nucleósidos y aminoácidos; esto facilita la biosíntesis de macromoléculas y organelos requeridos para el ensamblaje de nuevas células⁶⁰.

Bajo condiciones aeróbicas normales, las células procesan glucosa, primero a piruvato mediante glicólisis en el citosol y luego como dióxido de carbono en las mitocondrias; bajo condiciones anaeróbicas, la glicólisis es favorecida y relativamente muy poco piruvato es enviado a la mitocondria para la fosforilación oxidativa. Las células cancerosas deben compensar la baja eficiencia de la producción de ATP por glicólisis relativa a la fosforilación oxidativa

mitocondrial y lo hacen en parte sobre regulando los transportadores de glucosa, en especial GLUT1 y GLUT4, que sustancialmente incrementan la importación de glucosa al citoplasma⁶⁰. La sobreexpresión de GLUT1 ha sido asociada a una alta proliferación y un alto grado histológico⁶¹ y se ha definido como marcador de metástasis en cáncer de laringe⁶².

Adicionalmente, se sabe que la biogénesis mitocondrial está sobrerregulada en cáncer. Las mitocondrias desempeñan un papel central y multifuncional en la progresión del tumor maligno⁶³. Weinberg y colaboradores⁶⁴ pudieron observar que el metabolismo mitocondrial permite la generación de ROS el cual es requerido para la inducción de *K-RAS* que a su vez activa las rutas de ERK y MAPK. En su trabajo ellos demuestran que la fuente principal de ROS es el sitio Q₀ del complejo mitocondrial III y mediante la inactivación del factor de transcripción mitocondrial A (*TFAM*) en las células tumorales hubo una reducción en la tumorigénesis en un modelo murino de cáncer de pulmón mediado por *K-RAS*. Esto sugiere que el metabolismo mitocondrial y la generación de ROS son importantes para la proliferación celular inducida, en este caso en particular por *K-RAS*, así como la tumorigénesis.

Por otra parte, Sotgia y colaboradores analizaron la funcionalidad de las mitocondrias en tejidos de tumores de mama y observaron la expresión mediante inmunohistoquímica de 15 marcadores de biogénesis mitocondrial como *TFAM*, *PGC1 α* , *NRF1*, *NRF2*, entre otros, presentes selectivamente en células del tumor pero ausentes en células del tejido adyacente. Los autores concluyen que en CM coexisten 2 compartimientos metabólicamente distintos donde las células del

estroma presentan disfunción mitocondrial o son deficientes de estas por lo que utilizan la glicólisis como fuente para producir metabolitos de alta energía, como lactato y cetonas, que están disponibles para ser utilizados por las células cancerosas vecinas que son ricas en mitocondrias. En respuesta a este microambiente rico en compuestos energéticos, las células de cáncer promueven la biogénesis mitocondrial, amplificando su capacidad para el metabolismo oxidativo⁶⁵.

2.3 Búsqueda de biomarcadores en CMTN

En 2011 Lehmann y colaboradores⁶⁶, basándose en estudios realizados con microarreglos de expresión, propusieron que el CMTN puede clasificarse en 6 subtipos distintos los cuales difieren en su comportamiento clínico, sensibilidad a la quimioterapia y supervivencia (Tabla 3):

Tabla 3 Clasificación de Lehmann de los subtipos de CMTN.

Subtipo	Características
BL1	Alta expresión de genes de proliferación y defecto en respuesta a daño en DNA.
BL2	Señalización por factores de crecimiento e involucrados en la activación de glucólisis y gluconeogénesis.
IM	Compuesto por células de respuesta del sistema inmune.
M	Genes de TEM y diferenciación.
MSL	Genes asociados a TEM, diferenciación y células madre; angiogénesis y señalización por factores de crecimiento.
LAR	Expresión del receptor de andrógenos. RE- pero mantienen un elevado componente hormonal.

Esta subclasificación del CMTN ha permitido identificar nuevos blancos moleculares para el tratamiento de esta enfermedad como es EGFR, VEGF, p53, PARP, HSP90, COX2, TK y mTOR⁶⁷.

Distintos grupos de investigación están haciendo uso de las herramientas moleculares con el propósito de identificar nuevos blancos terapéuticos. Puede observarse en la tabla 4, cuya información fue obtenida del trabajo de Uscanga y colaboradores⁶⁷, las características de cada estudio y los principales genes expresados diferencialmente entre grupos. Se puede notar la variabilidad en los datos de cada estudio debido a la heterogeneidad de la muestra ya que algunos son obtenidos de análisis *in silico* utilizando bases de datos, otros son comparando la expresión de tejidos tumorales de CMTN embebidos en parafina y otros utilizando tejido fresco.

Tabla 4 Firmas genómicas obtenidas por análisis de perfiles de expresión en CMTN⁶⁷.

Autor	Resultados	Genes	Propósito de la firma	Diseño experimental	
				Muestra	Comparación
Rody, 2011	16 meta- genes: fenotipo basal, señalización por el receptor de andrógenos, células sistema inmune, Claudina CD24, adipocitos, inflamación y angiogénesi s (VEGF).	EPHB3, GABRP, AR, FOXA1, IgG, TCR, LCK, ITK, HLA-DR, -DM, -DP, -DQ, HLA- A, -B, -C, -E, -F, -G, OAS1, OAS2, OAS3, MX1, Decorina, Osteonectina, Fibronectina, COL5A1, CLDN3, CLDN4, CD24, ELF3, BUB1, CDC2, STK6, BIRC5, TOP2A, HBA1, HBA2, HBB, FABP4, PLIN, ADIPOQ, ADH1B, VEGF, adrenomedulina, ANGPTL4, IL-8, CXCL1, CXCL2, HOXA-4, -5, - 7, -9, -10, -11, Histonas H2A, H2B	Pronóstico, blanco terapéutico	Base de datos pública	394 CMTN

Karn, 2011	2 firmas (26 genes)	IL8, SCD, AQP3, SERPINE1, LYPDC1, PGK1, SEC23A, SNAPC1, SNF7DC2, SORT1, SPOCK, SRPX2, STC1, STMN2, SYNCRIP, TAX1BP3, TBC1D22B, TGFB2, TGFB1, THBS1, TIAM1, TLE6, TNFAIP1, TNFRSF10B, TRIM23, TSGA10, TXNDC9, U2AF1L1, ULBP2, UQCRC1, VLDLR, VMD2, WFDC1, WWTR1, ZA20D1, ZP2	Pronóstico	Base de datos pública	394 CMTN
Cascione, 2013	Firmas microRNA y 4 subgrupos de genes	miR-16, 155, 125b, 374a y miR-16, 125b, 374a, 374b, 421, 655, 497 Subgrupo molecular 1: SPP1, MMP9, MYB12, BIRC5, TOP2A, CDC2, CDKN2A. Subgrupo molecular 2: BCL2, EGF, ERBB4, AR, ESR1, IL1A, FGFR2, WT1, MYC, FGF2, AKT1, CASP10. Subgrupo molecular 3: MET, L1CAM, IGFBP3. Subgrupo molecular 4: TIMP1, TIMP2, CDKN1A, CCND2, MAP3K8, CAV1, LAMB1, JUN, CEBPA	Subclasificación, blanco terapéutico.	Tejido embebido en parafina.	CMTN vs. Tejido adyacente y lesiones en nódulos linfáticos.
Komatsu, 2013	322 genes desregulados	Sobreexpresados: UBE2C, S100P, UCHL1, PTTG1, UBE2T, SIX1, PRC1, TOP2A, HORMAD1, FABP5, ATAD2. Subexpresados: PIP, DNAL11, WIF1, SCUBE2, TBC1D9, TFF3, ERBB4, GATA3, MLPH, LAMAB, LTBP2, LIFR, LRP2, MASP2, MATN2, MGP, NTN4, NRG1, PTHLH, PI15, PLAT, PDGFA, PTN, PIGR, PIP, SCGB1D1, SCGB1D2, SCGB3A1, SEMA3G, STC2, THSD4, TFF3.	Blanco terapéutico	Tejido fresco	CMTN vs. Células de epitelio ductal

Al-Ejeh, 2014	8 genes	MAPT, MYB, MELK, MCM10, CENPA, EXO1, TTK y KIF2C	Pronóstico, blanco terapéutico.	Meta-análisis	CMTN vs. CMnTN
Khaled, 2015	1 gen	BCL11A	Blanco terapéutico	Base de datos pública	CMTN vs. CMnTN
He, 2015	2 genes	DUSP y FOXA1	Blanco terapéutico	Base de datos pública	CMTN vs- CMnTN
Velazquez 2014	4 genes	HIF-1a, c-MYC, 2OGDH y E-caderina	Blanco terapéutico, pronóstico	Tejido fresco	CMTN vs CMnTN vs tejido sano

3. ANTECEDENTES PARTICULARES.

Como antecedente de nuestro grupo de trabajo, en un estudio previo se analizó tejido fresco de 50 pacientes, 25 de ellas con CMTN y 25 CMnTN (luminales o Her2+) mediante microarreglos de expresión. En comparación con las firmas anteriormente publicadas, se observa una mayor homogeneidad de las muestras utilizadas ya que la comparación se realizó en tejido fresco y son representativas de una misma población.

En ese trabajo se logró establecer una firma de 40 genes expresados diferencialmente entre ambos grupos de estudio (Figura 6). Algunos de estos genes sobreexpresados en CMTN resultaron ser oncogenes recientemente relacionados a CM como *BCL11A* y *FOXC1*, sin embargo también se encontraron genes involucrados en procesos de metabolismo de lípidos, carbohidratos y de la insulina como *LPIN1*, *UGT8* y *HMGA1*, respectivamente, sugiriendo con esto un metabolismo más alterado para este subtipo tumoral⁶⁸.

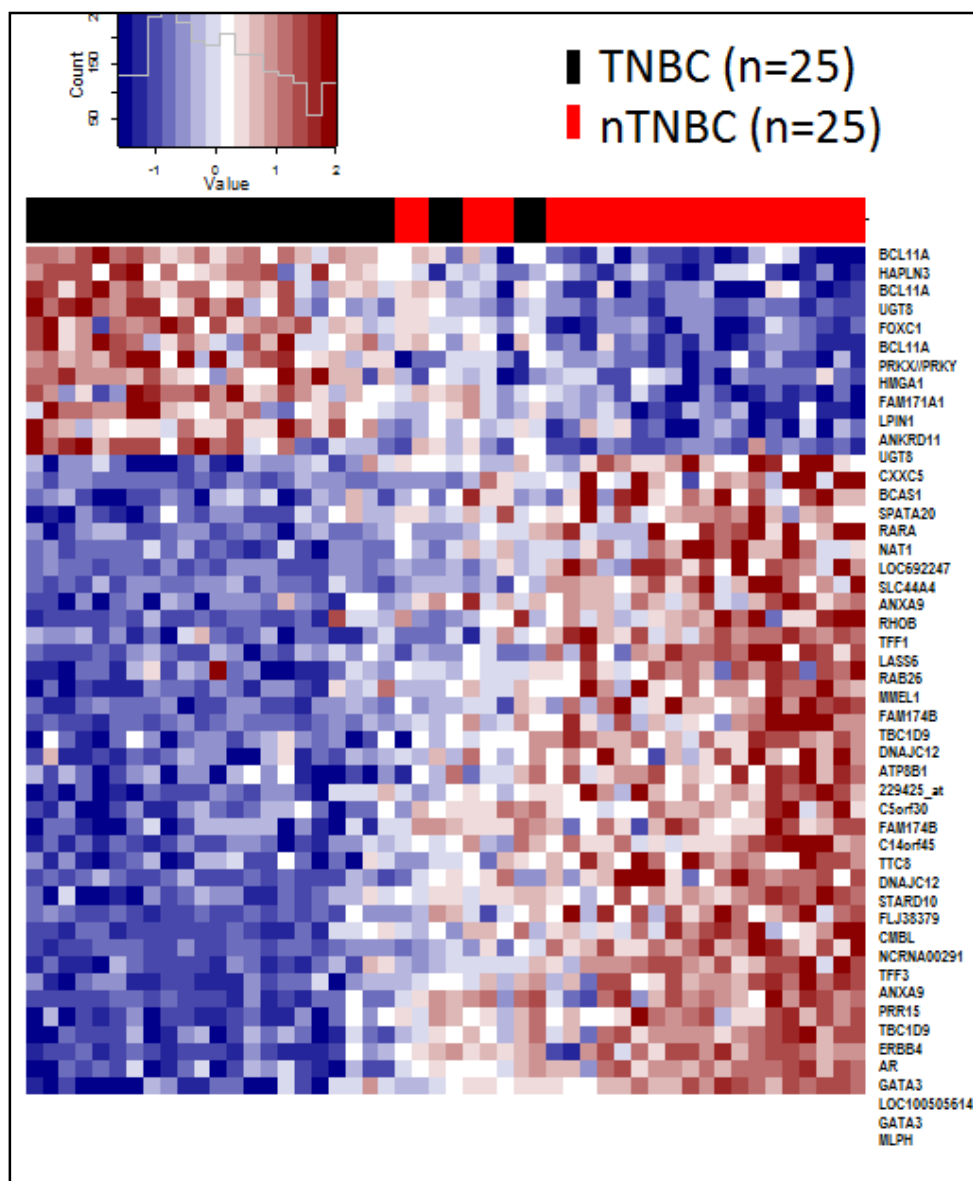


Fig. 6 “Heatmap” de los análisis de expresión global en tumores (Datos no publicados). En el panel superior izquierdo se puede observar la línea en color negro correspondiente a las 25 pacientes con CMTN y en color rojo las 25 pacientes con CMnTN. Del lado derecho se encuentran las sondas pertenecientes a los 40 genes que forman la firma genómica. Puede observarse que las pacientes con CMTN muestran una sobreexpresión de 9 genes (cuadros rojos) y subexpresión de 31 (cuadros azules) y una expresión contraria para las pacientes con CMnTN donde los 9 genes mostraron una subexpresión y 31 genes sobreexpresión en este grupo de estudio.

El gen *HMGA1* (del inglés High Mobility Group A1) codifica para una proteína que actúa como regulador transcripcional, contiene dominios de unión a regiones ricas en A-T en el DNA y regula la organización del complejo de transcripción⁶⁹. Este gen se expresa exclusivamente durante el desarrollo embrionario⁷⁰ pero se ha encontrado anormalmente expresado en distintos tipos de cáncer incluyendo tiroides, colon, mama, pulmón, ovario, endometrio, próstata y leucemia. Se han realizado ensayos en líneas celulares de CM donde se observaron niveles más altos de sobreexpresión en líneas metastásicas como Hs578T y MDA-231⁷¹.

Brunetti y colaboradores reportaron que este factor es necesario para la correcta transcripción del gen receptor de la insulina (IRS1)⁷² sugiriendo una posible función de *HMGA1* en el metabolismo celular. También, este gen se ha asociado a enfermedades metabólicas como es Diabetes Mellitus No-Insulino Dependiente⁷³ y Lipomatosis Pélvica⁷⁴.

Después de la obtención de la firma genómica de nuestro grupo de trabajo se realizó un análisis de interacción utilizando bases de datos públicas observándose una fuerte interacción de los genes de la firma con genes vinculados al metabolismo ubicándose de manera central en la red *INS*, *FASN* y *ACACA* (Figura 7), sugiriendo una participación importante del metabolismo celular.

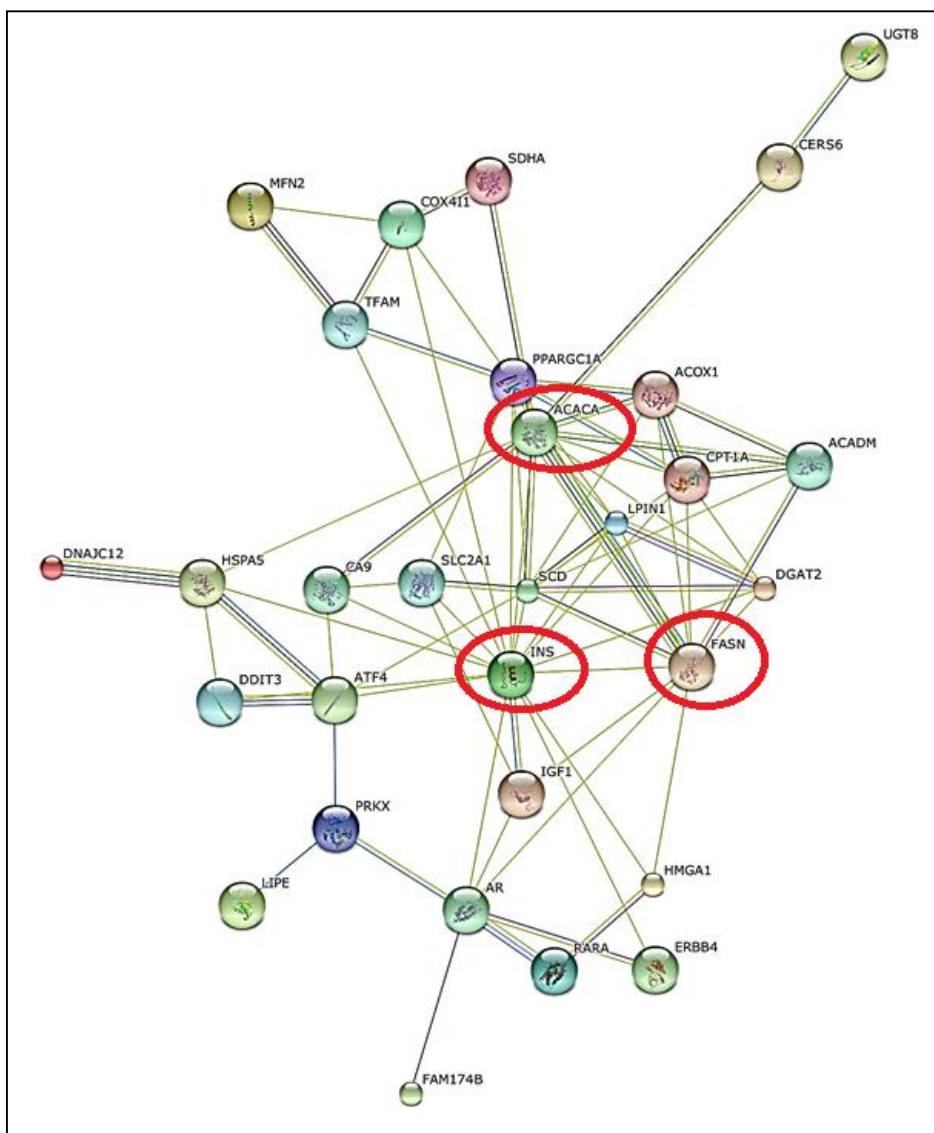


Fig. 7 Red de interacción de los genes de la firma con genes de metabolismo. Se ubican de manera central en la red de interacción los genes *INS* (insulina), *FASN* (sintasa de ácidos grasos) y *ACACA* (Acyl-CoA-carboxilasa- α) (en rojo) sugiriendo una estrecha relación entre el metabolismo celular con los genes de la firma genómica.

Con base en nuestros resultados, en este trabajo se realizó el análisis de expresión de 21 genes (Tabla 5) involucrados en el metabolismo de lípidos, carbohidratos, función mitocondrial y estrés del REnd en distintos subtipos de CM

con la finalidad de identificar rutas metabólicas y de daño celular potencialmente relevantes en el proceso tumoral en CM.

Tabla 5 Listado de genes candidatos y las rutas metabólicas en las que participan.

Ruta	Gen	
Lípidos	<i>ACACA</i>	Acetil-CoA Carboxilasa Alfa
	<i>FASN</i>	Sintasa de ácidos grasos
	<i>SCD</i>	Estearoil-CoA Desaturasa
	<i>DGAT2</i>	Diacylglicerol O-Aciltransferasa 2
	<i>CPT1A</i>	Carnitina Palmitoiltransferasa 1A
	<i>ACOX1</i>	Acil-CoA Oxidasa 1
	<i>LIPE</i>	Lipasa
	<i>ACADM</i>	Acyl-CoA Deshidrogenasa
Carbohidratos	<i>GLUT1</i>	Transportador de glucosa 1
	<i>INS</i>	Insulina
	<i>IGF1</i>	Factor de crecimiento tipo insulínico
	<i>INSR1</i>	Receptor de Insulina
Función mitocondrial	<i>PGC1A</i>	Proliferador de peroxisomas 1A
	<i>MFN2</i>	Mitofusina 2
	<i>TFAM</i>	Factor de transcripción mitocondrial
	<i>SDHA</i>	Succinato deshidrogenasa
	<i>COX4i1</i>	Subunidad 4 de la cadena transportadora de e ⁻
	<i>ITPR</i>	Receptor de Inositol 1,4,5-trifosfato
Estrés del RE	<i>CHOP</i>	Gen inducible a daño a DNA
	<i>ATF4</i>	Factor de transcripción activador 4
	<i>HSPA5</i>	Proteína de choque térmico 5

3. JUSTIFICACIÓN

El CM es una enfermedad compleja y se ha clasificado en distintos subtipos con base a una serie de biomarcadores inmunohistológicos y más recientemente moleculares. Actualmente el tratamiento para las pacientes con CM es definido por los marcadores inmunohistológicos en base a la presencia del RE, RP y/o HER2. En el caso del CMTN no existe un tratamiento dirigido siendo la quimioterapia la única opción.

El análisis de expresión diferencial entre CMTN vs CMnTN realizado por nuestro grupo de investigación reveló una firma genética en la que algunos de los genes identificados participan en el metabolismo de lípidos y carbohidratos. En un análisis de interacción, se observó que los genes en la firma presentan una relación estrecha con genes como el de la insulina y la sintasa de ácidos grasos sugiriendo una importante relación del metabolismo energético para este subtipo de cáncer.

Se sabe que la obesidad es uno de los factores de riesgo más importantes para padecer esta enfermedad y la población mexicana se encuentra entre las más obesas a nivel mundial; asimismo, la principal causa de muerte por cáncer en mujeres es el CM.

Es por todo lo anterior que en este proyecto consideramos extender el análisis a un grupo de 21 genes clave del metabolismo de lípidos y carbohidratos en distintos subtipos de CM para valorar la participación de éstos en el metabolismo tumoral.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General.

Analizar la expresión de un grupo de genes relacionados al metabolismo celular y entender sus implicaciones en el cáncer de mama.

4.2 Objetivos Específicos.

1. Analizar la expresión del grupo de genes en línea celular de mama y de cáncer de mama.
2. Analizar la expresión del grupo de genes en el tejido sano de mama.
3. Seleccionar genes diferencialmente expresados en las líneas celulares y analizar su expresión en tejido tumoral de mama.
4. Realizar la inhibición de *HMGA1* por iRNA y análisis de expresión global mediante microarreglos.
5. Realizar el análisis e integración de los resultados y determinar las implicaciones de los genes seleccionados en el CM.

5. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1 Materiales.

Material requerido para extracción de RNA: tubos de 0.2, 0.6, 1.5 y 2.0 mL de Eppendorf (Hamburgo, Alemania), hojas de bisturí de Hergom (D.F, México), cajas Petri de SyM laboratorios (Puebla, México), puntillas de 10, 20, 100, 200, 1000 µL, tubos de 15 mL de Corning (New York, USA) y perlas de acero de 5 mm (Satinless Steel Beads 5mm) de Qiagen (Maryland, USA).

Material requerido para análisis qPCR Tiempo Real: tubos de 0.2, 0.6, 1.5 y 2.0 mL de Eppendorf (Hamburgo, Alemania), puntillas de 10, 20, 100, 200, 1000 µL de Corning (New York, USA), placas y films para termociclador Light Cyclor 480 de Roche (Bazel, Suiza).

Material requerido para ensayo de inhibición con iRNA: tubos de 1.5 y 2.0 mL de Eppendorf (Hamburgo, Alemania), puntillas de 20, 100, 200 y 1000µL, pipetas serológicas, placas de cultivo de 25 y 75cm² y placas de cultivo de 96 pozos de Corning (New York, USA).

Material requerido para microarreglos: tubos de 0.2, 0.6, 1.5 y 2.0 mL de Eppendorf (Hamburgo, Alemania) y puntillas de 10, 20, 100, 200, 1000 µL de Corning (NY, USA).

Reactivos

Para la extracción de RNA: para líneas celulares y biopsias tumorales se utilizó el Kit RNAeasy MiniKit de Qiagen (Meryland, USA), Etanol de J.T. Baker (USA) y PBS de Sigma-Aldrich (Seelze, Alemania). Agarosa, TRIS, EDTA, buffer

de carga y marcador de peso molecular 100-1000 de Bio-Rad (Hercules, USA) y Quant-iT Ribogreen RNA Assay Kit de Thermo Scientific (Willminton, USA).

Para análisis qPCR Tiempo Real: High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit de Life Technologies (Carlsbad, USA), LightCycler 480 SYBR Green I Master de Roche (Bazel, Suiza) y agua grado molecular Accugene (Walkersville, USA)

Para el ensayo de inhibición con iRNA: Medio de cultivo DMEM y antibiótico/antimicótico de Caisson (North Logan, USA), medio RPMI-1640 de Sigma-Aldrich (Seelze, Alemania), suero bovino fetal y medio OptiMEM de Gibco distribuido por Thermo Scientific (Willminton, USA). RNAs de interferencia (siRNA) para *HMGA1*, para *GAPDH*, el control negativo “scramble” y kit de transfección (Silencer® siRNA Transfection II Kit) de Ambion (distribuido por Life Technologies - Carlsbad, USA). Sondas TaqMan para *HMGA1* y *GAPDH* y TaqMan Universal Master Mix de Life Technologies (Carlsbad, USA).

Para el análisis de expresión global: análisis de RNA con Experion RNA Analysis Kits de Bio-Rad (Hercules, USA) y etanol de J.T. Baker (USA). Para microarreglos: GeneChip 3'IVT Express Kit y GeneChip Hybridation, Wash and Stain kit de Affymetrix (Santa Clara, USA).

Material Biológico y Muestras

Se utilizaron 6 líneas celulares de cáncer de mama HCC1395, BT483, HCC1954, MCF7, MDA-MB-231 y BT474 y una de mama normal inmortalizada MCF-12A de ATCC (Virginia, USA), primers de IDT (San Diego, USA), biopsias

de tejido fresco y ácidos nucleicos: RNA total (RNA) y DNA complementario (cDNA).

Equipo

Para la extracción de RNA: Centrífuga 5417R y Thermomixer comfort, ambos de Eppendorf (Hamburgo, Alemania). TissueLyser de Qiagen (Maryland, USA). Cámara electroforesis Mini-sub® Cell GT, transiluminador Molecular Imager® GelDoc™ XR+ Imaging system y fuente de poder PowerPac™ Basic todos de Bio-Rad (Hercules, USA). Vortex de Scientific industries (New York, USA) y Nanodrop® ND8000 Spectrophotometer de Thermo Scientific (Willminton, USA).

Para análisis de PCR en Tiempo Real (qPCR): Termociclador veriti de Life Technologies (Carlsbad, USA), Termociclador Light Cycler 480 de Roche (Bazel, Suiza), Campana de PCR de UVP (Upland, USA), vortex de Scientific industries (New York, USA) y centrífuga minispin de Labnet (Edison, USA).

Para el ensayo de inhibición con iRNA: Incubadora de CO₂ Serie 8000WJ y Nanodrop ND8000® Spectrophotometer de Thermo Scientific (Willminton, USA), Campana de flujo laminar Clase II Tipo A2 de Labconco (Kansas, USA), centrífuga 5810R Eppendorf (Hamburgo, Alemania) y microscopio Primo Vert de Zeiss (Göttingen, Alemania).

Para microarreglos: Termociclador GenAmp de Pelkin Elmer (Waltham, USA), Thermomixer de Eppendorf (Hamburgo, Alemania), Nanodrop® de Thermo Scientific (Willminton, USA), Experion™ Automated Electrophoresis Station de

Bio-Rad (Hercules, USA). GeneChip Hybridation Oven 645, GeneChip Fluidics Station 450 y GeneChip Scanner 3000 7G de Affymetrix (Santa Clara, USA). Vortex de Scientific industries (New York, USA) y centrífuga minispin de Labnet (Edison, USA).

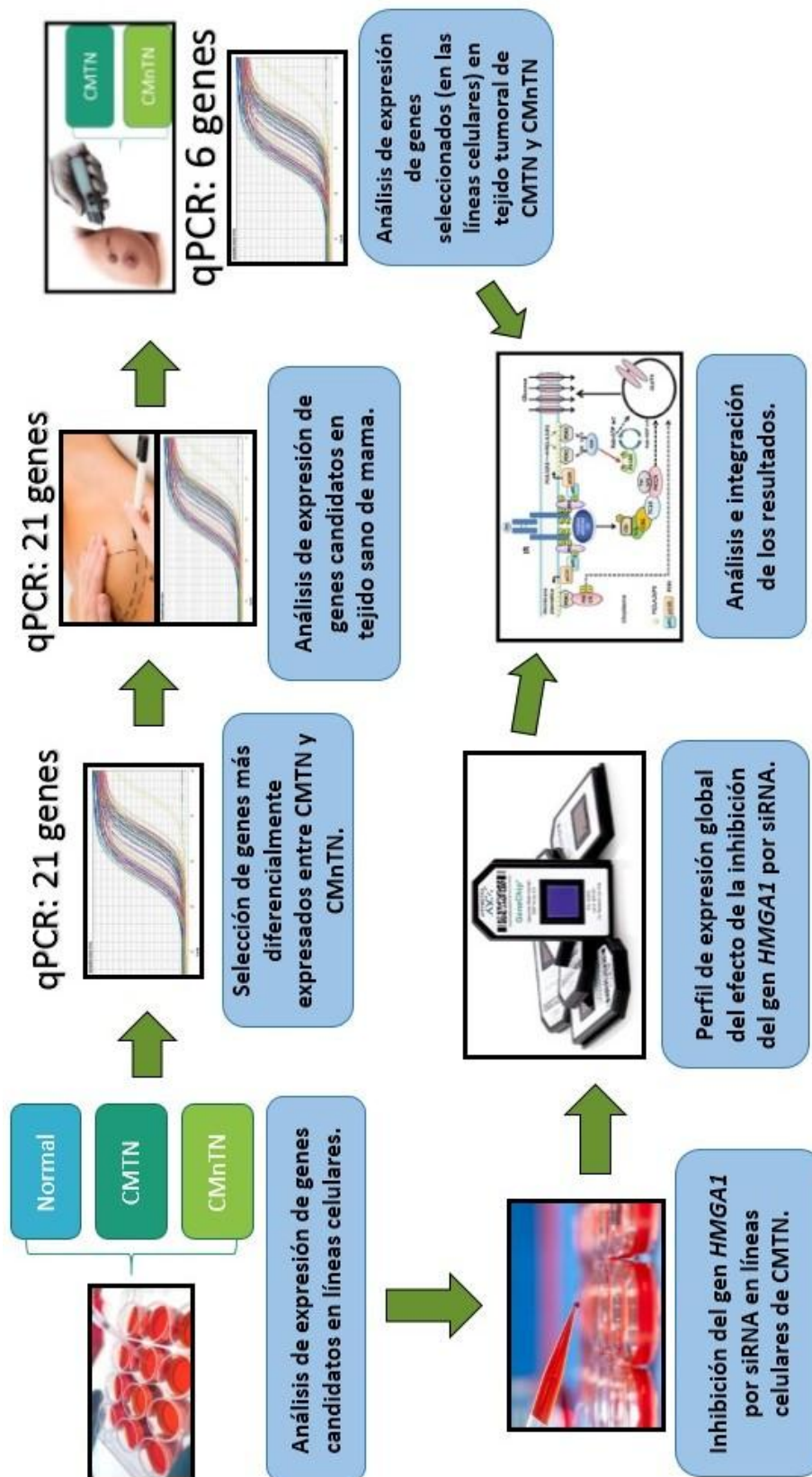
Programas y plataformas computacionales.

Software Graphpad Prism 6 para Windows (California, USA). GeneChip Command Console Software (AGCC) y GeneChip Console Software, ambos de Affymetrix (Santa Clara, USA). DAVID: Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (Maryland, USA) disponible en: <https://david.ncifcrf.gov> y STRING: Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins disponible en: <http://string-db.org>.

5.2 Lugar donde se realizó el estudio.

Este proyecto se llevó a cabo en el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como en la Unidad de Genómica del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la misma universidad.

5.3 Estrategia general.



5.4 Metodología experimental.

La metodología utilizada en este proyecto se describe a continuación siguiendo el orden de los objetivos de este trabajo:

Condiciones de cultivo de las líneas celulares.

En la siguiente tabla se describen las condiciones de cultivo específicas para cada subtipo celular:

Tabla 6 Condiciones de cultivo de las líneas celulares.

Línea celular	Subtipo de CM	Condiciones
MCF-12^a	Mama normal	Medio MEGM, 10% SBF, 1X A/A
HCC-1954	HER2+: tumor primario	Medio RPMI-1640, 10% SBF, 1X A/A
BT474	Luminal B: tumor primario	Medio DMEM, 10% SBF, 1X A/A
BT483	Luminal A: tumor primario	Medio DMEM, 20% SBF, 1X A/A
MCF7	Luminal A: metástasis	Medio DMEM, 10% SBF, 1X A/A
HCC1395	CMTN: tumor primario	Medio RPMI-1640, 10% SBF, 1X A/A
MDA-231	CMTN: metástasis	Medio DMEM, 10% SBF, 1X A/A

*Todas las líneas fueron cultivadas a 37°C con 5% de CO₂. **SBF**: Suero bovino fetal. **A/A**: Antibiótico/Antimicótico.

Extracción de RNA.

Se trabajó con las células hasta que alcanzaron una confluencia de crecimiento del 90% y posteriormente se realizó la extracción de RNA utilizando el kit de Qiagen RNeasy siguiendo las instrucciones del fabricante.

La extracción de RNA de tejido fue hecha a partir de tejido congelado utilizando un máximo de 30mg de biopsia y fueron homogenizados en el TissueLyser con perlas magnéticas. El método de digestión con proteinasa K fue utilizado junto con el kit de Qiagen RNeasy que permite la obtención de RNA de

excelente calidad en biopsias pequeñas de tejido. En todos los casos se siguieron las instrucciones de la casa comercial.

La calidad de RNA fue determinada mediante electroforesis capilar utilizando el Experion™ Automated Electrophoresis Station y la cuantificación fue determinada mediante el equipo NanoDrop® ND8000 Spectrophotometer y mediante el kit Quant-iT Ribogreen.

Estandarización de primers por PCR punto final y tiempo real.

Los primers para los 21 genes fueron obtenidos directamente de la casa comercial IDT para qPCR y las secuencias se muestran en la Tabla 7:

Tabla 7 Listado de primers utilizados.

Gen	Forward	Reverse
ACACA	GTACATCGCTGACACTAGCTAC	CTGCCCACATCTCATCCAAA
FASN	CGGAGTGAATCTGGGTTGATG	TTTGATGCCTCCTTCTTCGG
SCD	GGAATTATGAGGATCAGCATGTG	CTCTTTCTGATCATTGCCAACAC
PGC1α	CTCTACGCAGGTGAGGAAGG	ACAGGCACTCTGGAGGAAGA
CPT1A	TCCAAGTCAAACAGCTCCAC	GTCACCTCTTCTGCCTTTACG
ACOX1	CAGTGACTTCAGGTGCTTGT	GGATGTGACACTTGGCTCTG
GLUT1	GGCCACAAAGCCAAAGATG	GTGCCATACTCATGACCATCG
ATF4	GCATCCAAGTCGAACTCCTT	GTCAGTCCCTCCAACAACAG
SDHA	CAGAGCAGCATTGATTCCTC	TTTGATGCAGTGGTGGTAGG
COX4i1	AAATTGCTCGCTTGCCAAC	CGGAGTCTTCCTCGATCCC
CHOP	CAATGACTCAGCTGCCATCT	AGCGACAGAGCCAAAATCAG
MFN2	GCAGGTACTGGTGTGTGAAC	GTTCTTGACTCACTTCAGAGCA
TFAM	GCCAAGACAGATGAAAACCAC	TGGGAAGGTCTGGAGCA
LIPE	GAAGGACACCAGCCCAAT	AGTATGTCACGCTGCATAAGG
ACADM	AGGAGCTTTAGGATCTGGATCA	AGGCTCTGATGTAGCTGGTAT
IGF1	CACTCCCTCTACTTGCGTTC	CATGCCCAAGACCCAGAAG
IRS1	GCATCGTACCATCTACTGATGAG	AGTAGCTCAACTGGACATCAC
INS	CTTCACGAGCCCAGCCA	ATCAGAAGAGGCCATCAAGC
IGF1R	CTTATTGGCGTTGAGGTATGC	AGTTATCTCCGGTCTCTGAGG
HSPA5	AGACTAGATACTCGTGTGTGGG	CACTCTTGGGACCTGTGAAATG
ITPR	CATGAATGTCAACCCACA	ATCTATAATCTGGTTCAAGTGC
β-actina	TGCTATCCCTGTACGCCTCT	CTCCTTAATGTCACGCACGA
GRAMD1	CTGAGCCGTAGCACTGATG	GCTGCTTCCTCCTCATCTTC
GAPDH	CTCCTCACAGTTGCCATGTA	GTTGAGCACAGGGTACTTTAT TG

Con el cDNA de la línea celular MCF7 se realizó la estandarización de los 21 primers mediante PCR punto final en gradiente de temperatura con 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 67°C, 68°C y 69°C y posteriormente análisis en gel de agarosa al 2% para seleccionar la temperatura óptima a la cual no existía amplificación de productos inespecíficos.

Posteriormente mediante qPCR se realizaron las curvas de eficiencia de amplificación para cada uno de los genes con 5 concentraciones distintas de cDNA: 2000ng, 200ng, 20ng, 2ng y 0.2ng así como el análisis de la curva melting para observar la amplificación de un solo producto. Fueron permitidos valores de error <0.15 y de eficiencia entre 1.85 y 2.

Análisis de expresión por qPCR de los 21 genes en líneas celulares.

Se realizó el análisis de expresión de los genes *ACACA*, *FASN*, *SCD1*, *DGAT2*, *CPT1A*, *ACOX1*, *GLUT1*, *IGF1*, *IGF1R*, *INS*, *IRS1*, *CHOP*, *ATF4*, *HSPA5*, *PGC1A*, *MFN2*, *TFAM*, *SDHA*, *COX4I1*, *ITPR1* y *ACADM* en cada una de las 7 líneas celulares. Se utilizó RNA total extraído de las líneas celulares para someterlos a retro-transcripción con el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit con OligodT y usando 200ng de cDNA se realizaron los análisis de expresión utilizando el agente intercalante SybrGreen y el gen GAPDH como gen endógeno. Se realizó el análisis de expresión relativa con el método de Fold change. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba T de student con valores de $p < 0.05$, $p < 0.01$ y 0.001 y se graficó con el software GraphPad Prism 6.

Análisis de expresión por qPCR de los 21 genes en tejido sano.

Se contó con el RNA de una muestra de tejido sano el cual fue cuantificado por espectrofotometría utilizando el equipo Nanodrop y posteriormente fue utilizado para hacer el ensayo de expresión de cada uno de los 21 genes y también de GAPDH como gen endógeno.

Ensayos de expresión en tejido tumoral de mama.

Se realizó la extracción de RNA a partir de tejido de 17 tumores de CMTN y 16 de tumores de CMnTN, se realizó su cuantificación y análisis de integridad por los métodos descritos anteriormente.

Selección del gen endógeno.

Se realizó un ensayo de estabilidad y eficiencia del gen endógeno entre los 3 genes endógenos disponibles *GRAMD1*, *β -Actina* y *GAPDH*. Se realizaron 4 diluciones partiendo de 1000ng, 250ng, 100ng y 10ng de un cDNA obtenido de tumor no-triple negativo denominado T-09 (ver Tabla 4) y se realizó la amplificación de cada gen endógeno así también para cada uno de los 6 genes seleccionados con triplicados técnicos. Se graficaron los ΔCt ($Ct_{\text{gen}} - Ct_{\text{endógeno}}$) en el eje “Y” y el logaritmo de la concentración de cDNA utilizada en el eje de las “x”. Posteriormente fue calculada la ecuación de la recta donde es importante obtener valores de pendiente ≤ 0.1 . El gen endógeno que presentó un comportamiento más estable o valor cercano a 0 fue *GAPDH*.

Análisis de expresión por qPCR de los 6 genes en tejido tumoral de mama.

Se seleccionaron 6 genes *GLUT1*, *INS*, *IRS1*, *LIPE*, *TFAM* y *COX4i1* para ser analizados en el cDNA de las muestras de tumores empleando el agente intercalante SybrGreen y como gen endógeno a *GAPDH*. Se realizaron triplicados técnicos y el análisis se hizo utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para cada uno de los genes. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba Kolmogorov-Smirnov (KS) con valores de $p < 0.05$ y $p < 0.01$ con el programa estadístico R y se graficó con el software Origin®.

Silenciamiento con siRNA.

Se realizó el ensayo en 2 líneas de CMTN: HCC1395 (tumor primario) y MDA-MB-231 (metastásica). Se crecieron en medio de cultivo DMEM + 10% SBF + 1% antibiótico/antimicótico para MDA-MB-231 y en medio RPMI + 10% SBF + 1% antibiótico/antimicótico para HCC1395 hasta alcanzar una confluencia del 90%. Posteriormente se levantaron las células con tripsina + EDTA y se realizó el conteo con la cámara de Neubauer. Se sembraron 20,000 células por pozo en medio OptiMEM en placas de 96 pozos y se realizó la transfección utilizando del kit Silencer® siRNA Transfection II el agente SiPort Amine siguiendo las instrucciones del fabricante con o sin los siRNA's dependiendo la condición como se describe a continuación:

A o E: células sin ningún tratamiento.

B o F: células más el agente transfectante.

C o G: células, agente transfectante y siRNA scramble.

D o H: células, agente transfectante y siRNA contra HMGA1.

Columna 11: control interno, células en su medio de cultivo (RPMI o DMEM)

Columna 12: células, agente transfectante y siRNA contra GAPDH.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Tiempo 0					Tiempo 48					G A P D H
C												
D												
E												
F		Tiempo 24					Tiempo 72					
G												
H												

Fig. 8 Diseño experimental de la placa para el ensayo de inhibición de *HMGA1*.

Las repeticiones técnicas se hicieron por quintuplicado. Se llevó a cabo el ensayo por un total de 72 horas donde se realizó la extracción de RNA de las células a las 0, 24, 48 y 72 horas de la inhibición. La extracción fue realizada con el kit de Qiagen RNeasy y se cuantificó con el equipo NanoDrop ND8000 Spectrophotometer. Posteriormente se realizó una retrotranscripción con OligodT partiendo de 100ng totales de RNA. La medición de la inhibición por qPCR se realizó utilizando sondas Taqman para *HMGA1* y para *GAPDH* con triplicados técnicos y haciendo el cálculo del porcentaje de inhibición como se describe: Se calculó el ΔCt de cada uno de los triplicados (resta del Ct de la muestra donde se inhibió *HMGA1* menos el Ct del gen endógeno *GAPDH*) de cada condición

(condición inhibida y condición scramble) y se elevó a $2^{-\Delta C_t}$, luego se realizó la división del valor de $2^{-\Delta C_t}$ de la condición con inhibición de *HMGA1* entre el valor de $2^{-\Delta C_t}$ de la condición scramble (control). Los valores obtenidos fueron promediados y se calculó el porcentaje mediante la ecuación $(1 - \text{valor}) \times 100$. Esto se realizó para cada uno de los tiempos de inhibición.

Análisis de expresión global en líneas celulares con o sin silenciamiento de HMGA1.

Se analizó el perfil de expresión genómico en las dos líneas celulares (HCC1395 y MDA231) con o sin silenciamiento de HMGA1, utilizando el protocolo de Affymetrix GeneChip 3'IVT Express Kit. A partir del RNA de cada una de las 2 líneas celulares de CMTN donde se realizó el ensayo de inhibición, se utilizó el RNA que presentó el mayor porcentaje de inhibición del gen *HMGA1* (a las 48hrs) así como la condición control (scramble). Se realizó la preparación de controles poly-A y su agregado al RNA total, posteriormente se sintetizó la primera y segunda cadena de cDNA para, a partir del cDNA, realizar la transcripción *in vitro* (IVT) y generar aRNA (RNA amplificado) marcado. El aRNA marcado fue purificado usando perlas magnéticas las cuales se unen al aRNA y usando un magneto fueron retenidas mientras fueron lavadas con etanol y soluciones de lavado y finalmente se eluyó en NF-H₂O a 65°C donde se obtuvo aRNA marcado purificado. El aRNA marcado y purificado se cuantificó por NanoDrop ND8000 donde fue necesario una concentración mínima de 15µg para continuar con la fragmentación, esta se realizó usando el buffer de fragmentación y se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% para RNA (tratado con DEPC) cargando

1 μ L de cada muestra observando un barrido en el gel lo cual indica una buena fragmentación de la muestra. Posteriormente se realizó la hibridación colocando la muestra en una mezcla de hibridación dentro del chip Affymetrix HU-U133 Plus 2.0 GeneChip, y dejando hibridar en el horno de hibridación por 16 horas a 45°C a una velocidad de rotación de 60 rpm usando el GeneChip Hybridation, wash and stain kit. Al finalizar la hibridación, la muestra se retiró del chip y se rellenó con solución Holding buffer para ser lavado en la estación de fluidos 450 de la plataforma de Affymetrix, se seleccionó el programa específico para el tipo de chip y en este proceso se incluyeron lavados con buffers de lavado del kit, así como el uso de soluciones de tinción para poder ser detectada la señal en el escáner. Al finalizar la estación de fluidos, el cartucho se rellenó con holding buffer y evitando que se hubieran generado burbujas, se colocó en el escáner de Affymetrix donde se escaneó y se generó tanto la imagen como los archivos necesarios para su posterior análisis usando el software Affymetrix Microarray Suite versión 5.0.0.032 y el programa R.

Los datos fueron transformados a valores logarítmicos para su representación y análisis. Los datos representan el cálculo del valor de Fold Change entre las 2 condiciones (inhibición y control) tomándose en cuenta valores de Fold Change ≥ 1 o ≤ -1 en la línea HCC1395 y ≥ 0.75 o ≤ -0.75 en la línea MDA-231. La sobre o subexpresión para cada sonda fue asignada utilizando los valores de Fold Change mencionados anteriormente donde un valor de 1 corresponde al doble de la expresión de dicha sonda.

6. RESULTADOS

6.1 Características generales de la población estudiada.

6.1.1 Líneas celulares: Las líneas celulares de mama fueron obtenidas directamente de ATCC. En la Tabla 8 se resumen las características de las líneas utilizadas.

Tabla 8 Características de las líneas celulares.

#ATCC	Línea	Subtipo	Fuente
HTB-21	BT483	Luminal A	Tumor primario.
HTB-22	MCF7	Luminal A	Metástasis/ Efusión pleural.
CRL-2338	HCC1954	HER 2+	Tumor primario.
CRL-2324	HCC1395	Triple negativo	Tumor primario.
HTB-26	MDA-MB-231	Triple negativo	Metástasis/ Efusión pleural.
HTB-20	BT474	Luminal B	Tumor primario.
CRL-10782	MCF-12A	-	Mama normal/ inmortalizada espontáneamente.

6.1.2 Muestras de pacientes: Las muestras fueron obtenidas directamente del banco de tejidos tumorales formado durante la tesis doctoral de Santuario-Facio⁶⁸, estas muestras fueron obtenidas de biopsias de pacientes mediante punción con aguja gruesa (true cut), previo firma de consentimiento informado, que acudieron a consulta con nódulo mamario por sospecha de malignidad (Julio 2011 – Agosto 2012) y que después de la confirmación histopatológica fueron sometidas a tratamiento.

Para este trabajo se utilizaron 17 muestras de CMTN y 16 de CMnTN (positivo a receptores de hormonas o a HER2) previo a cualquier tratamiento. La Tabla 9 resume las características de las pacientes y de los tumores analizados.

Tabla 9 Características clinicopatológicas de las pacientes.

Muestra	Subtipo	Edad	IMC	Glucosa (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	Estadio Cáncer
T-06	TN	58	28.15	N/A	N/A	ESTADIO IIIA
T-26	TN	42	29.17	94	136	ESTADIO IIB
T-33	TN	50	25.22	95	174	ESTADIO IIIA
T-34	TN	71	N/A	108	N/A	ESTADIO IIIC
T-38	TN	63	25.97	93	203	ESTADIO IIB
T-47	TN	44	N/A	88	162	ESTADIO IIA
T-52	TN	39	22.89	90	173	ESTADIO IIIA
T-70	TN	48	25.56	103	166	ESTADIO IIIB
T-96	TN	45	20.78	105	143	ESTADIO IIIA
T-121	TN	58	27.11	109	266	ESTADIO IIB
T-134	TN	42	38.01	104	138	ESTADIO IIIA
T-141	TN	56	26.30	102	217	ESTADIO IIIA
T-152	TN	42	33.73	183	191	ESTADIO IIIA
T-160	TN	67	N/A	N/A	N/A	ESTADIO IIB
T-174	TN	50	31.43	110	200	ESTADIO IIB
T-180	TN	48	28.16	91	246	ESTADIO IIIC
T-225	TN	54	30.04	90	196	ESTADIO IIA
T-01	POSITIVO HORMONAS	49	33.3	110	158	ESTADIO IIA
T-04	LUMINAL B	66	26	132	241	ESTADIO IIB
T-09	LUMINAL B	60	34.9	97	252	ESTADIO IIB
T-10	LUMINAL A	64	22.4	102	210	ESTADIO IIB
T-13	LUMINAL A	54	18.4	91	207	ESTADIO IIIB
T-14	HER2NEU	40	30.48	103	204	ESTADIO IIB
T-15	HER2NEU	47	N/A	91	180	ESTADIO IIIB
T-20	LUMINAL A	56	26.35	N/A	N/A	ESTADIO IIIA
T-23	POSITIVO HORMONAS	53	N/A	N/A	N/A	ESTADIO IIIA
T-30	LUMINAL A	49	29	N/A	189	ESTADIO IIA
T-31	LUMINAL A	48	32.46	100	190	ESTADIO IIB
T-36	LUMINAL A	54	24.44	91	180	ESTADIO IIB
T-43	HER2NEU	59	27	131	222	ESTADIO IIB
T-49	LUMINAL A	54	18.4	91	207	ESTADIO IIIB
T-57	HER2NEU	65	36.9	127	138	ESTADIO IV
T-68	HER2NEU	49	21.6	N/A	N/A	ESTADIO IIB

6.2 Validación de métodos.

Se realizó la extracción de RNA de todas las líneas celulares, se cuantificó obteniendo ~300-500ng/μL de RNA total y se analizó su integridad obteniendo valores de RQI ≥ 9 . Posteriormente se realizó una RT-PCR con un total de 2000ng de RNA para la obtención de cDNA de cada línea celular.

Se estandarizó cada par de primers en el cDNA de la línea celular MCF7 por PCR punto final realizando rampas de temperatura con rangos de 62°C a 70°C para definir la temperatura a la cual no existía la presencia de amplificados de productos inespecíficos observables en el gel de agarosa (Fig. 9)

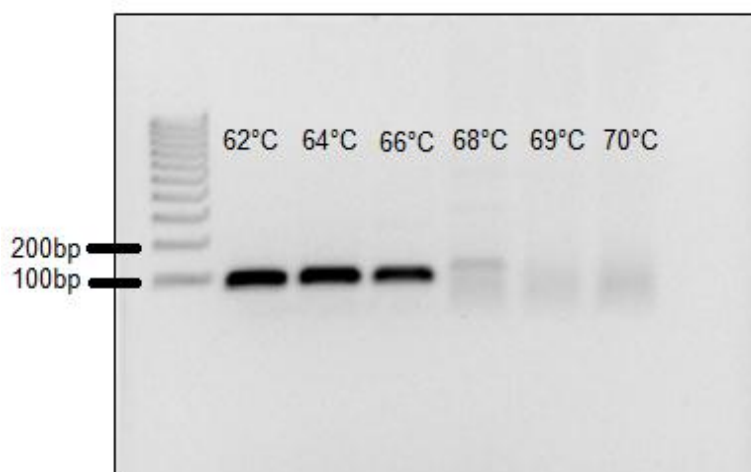


Fig. 9 Gel de agarosa al 2% de PCR punto final en gradiente de temperatura. Imagen representativa de la PCR punto final del gen *TFAM*.

Posteriormente se realizaron por qPCR las curvas de eficiencia para cada uno de los genes utilizando 5 concentraciones distintas de cDNA: 2000, 200, 20, 2 y 0.2 ng/μL. Se analizó la curva melting y la curva estándar permitiendo valores de eficiencia en un rango de 1.85 a 2 y valores de error < 0.15 (Figura 10). Con todo esto se definieron las temperaturas de amplificación de cada par de primers

y se estableció una concentración de 200ng de cDNA para realizar los ensayos de expresión en las líneas celulares.

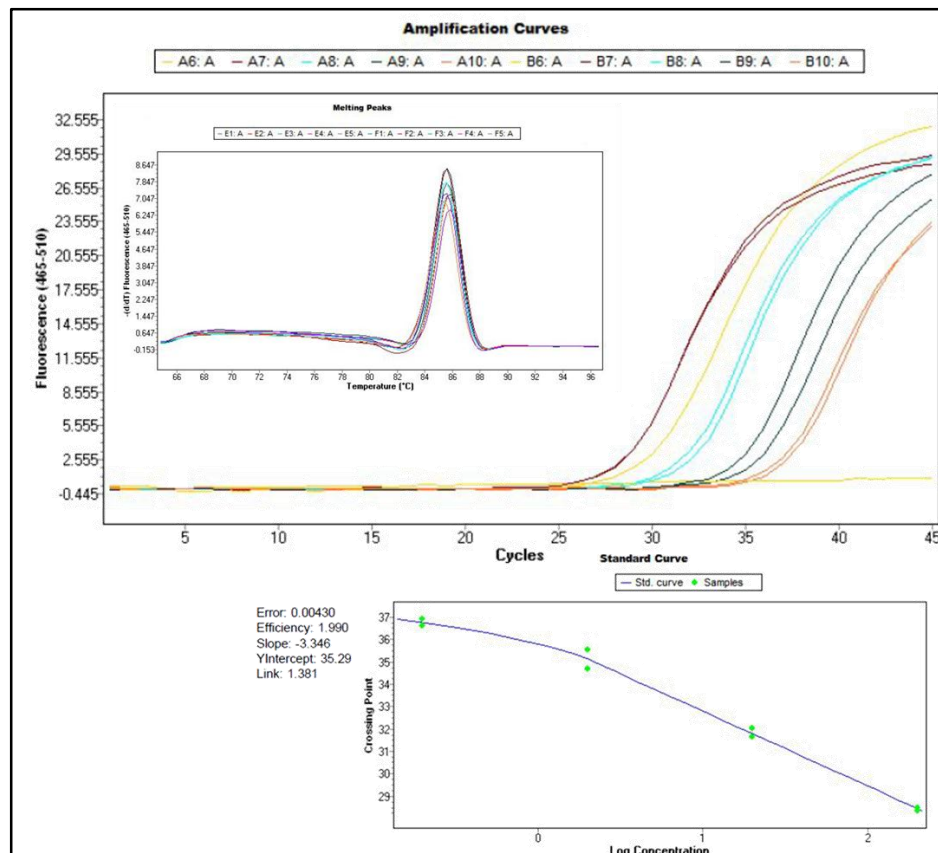


Fig. 10 Curvas de amplificación, curva melting y curva de eficiencia. Imagen representativa de los resultados de estandarización del gen MFN2 por qPCR.

6.2.1 Selección de gen endógeno para ensayos en muestras tumorales.

La selección del gen endógeno para el ensayo en líneas celulares fue realizada con anterioridad por nuestro grupo de investigación siendo *GAPDH* el que presentó una expresión más estable.

Para las muestras tumorales se realizaron ensayos de estabilidad de 3 genes endógenos disponibles (*GAPDH*, *β -actina* y *GRAMD1*) para cada uno de los 6 genes seleccionados (*TFAM*, *COX4i1*, *GLUT1*, *IRS1*, *INS* y *LIPE*) en cDNA

de tejido tumoral. Pudo observarse un comportamiento más estable o valores de pendiente más cercanos a 0 en el gen *GAPDH* en comparación a los otros 2 genes endógenos candidatos como se muestra en las siguientes gráficas (Figura 11) representativas de los resultados obtenidos para el gen *INS*:

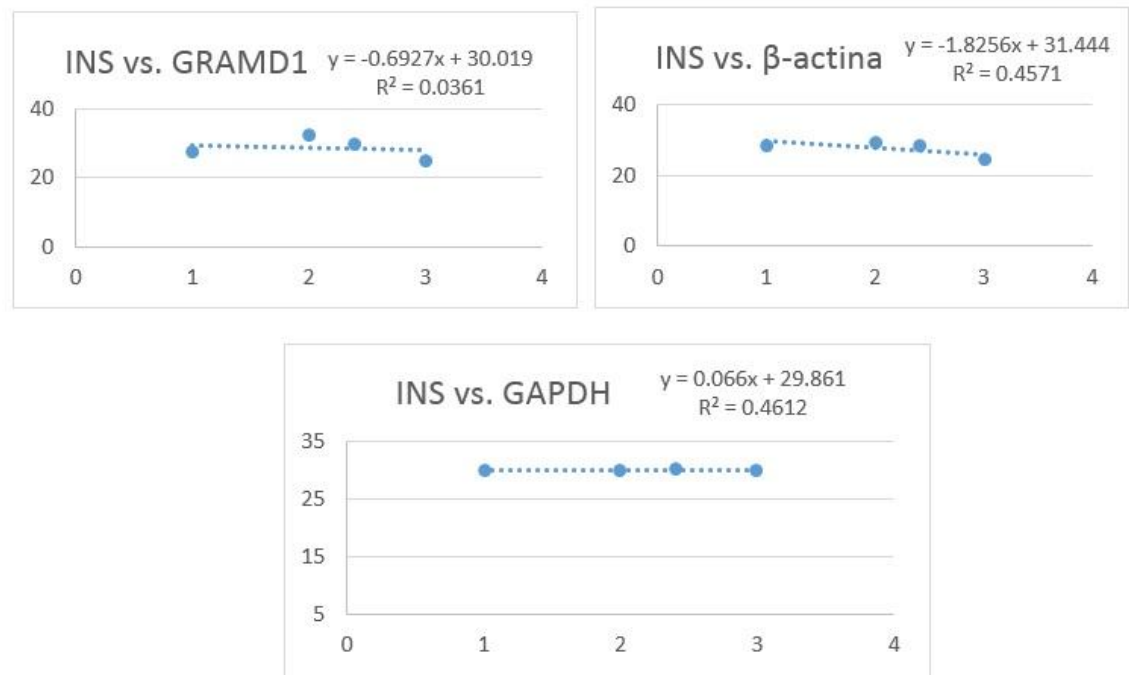


Fig. 11 Prueba de estabilidad y eficiencia del gen endógeno. Gráficas representativas del ensayo en el gen *INS*.

6.3 Análisis de expresión en líneas celulares de cáncer de mama.

La línea celular BT483 de CM subtipo Luminal A de tumor primario presentó una mayor expresión de los genes *IGF1R*, *ITPR1* ($p < 0.0001$, t de student) y *PGC1α* ($p < 0.001$) (Figura 12 A, B y C) y fue diferencialmente significativa comparada con las demás líneas celulares. También fue la línea que menor expresión presentó del gen *ACADM* ($p < 0.0001$) y *ACOX1* ($p < 0.05$) (Figura 12 D y E).

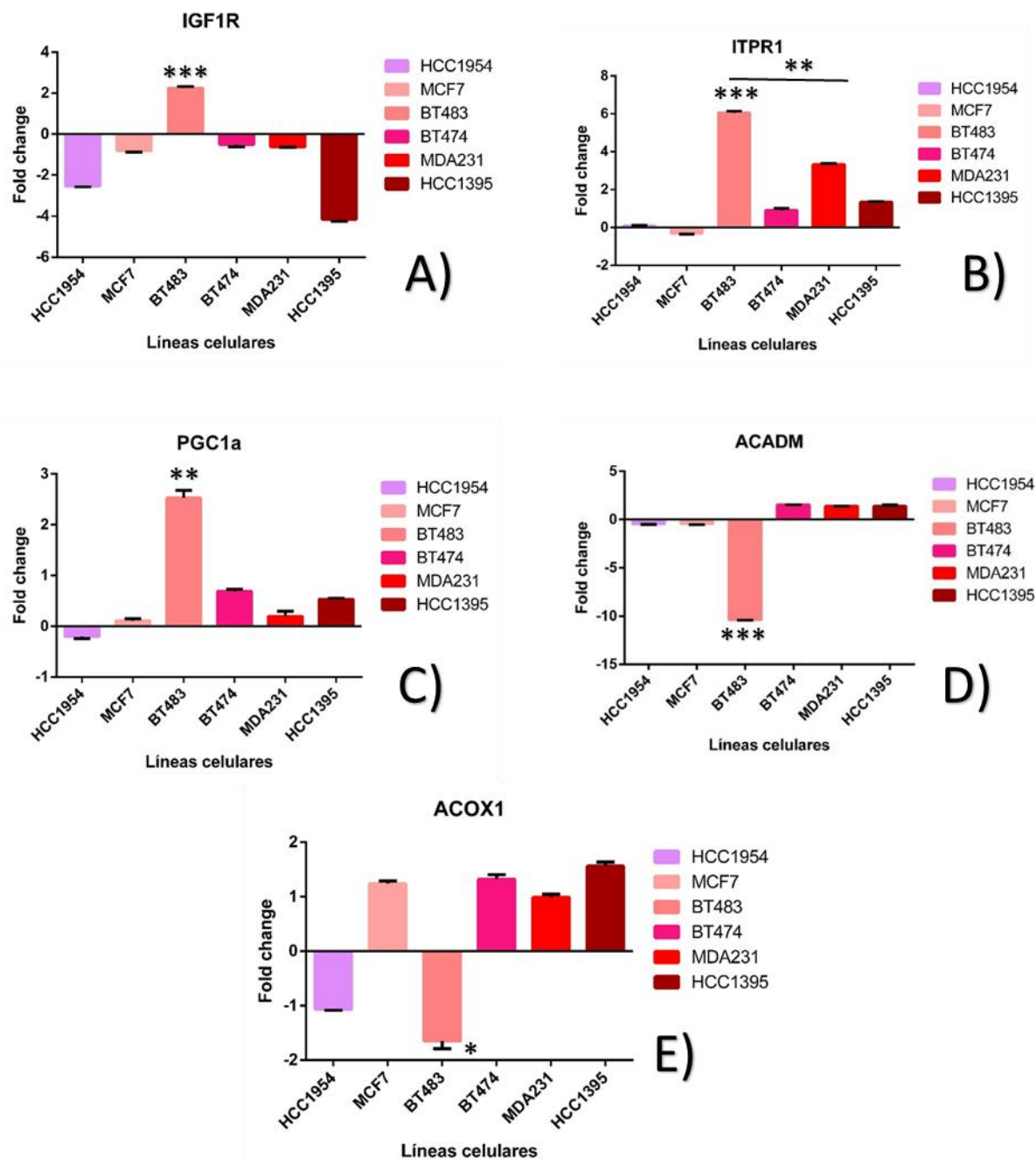
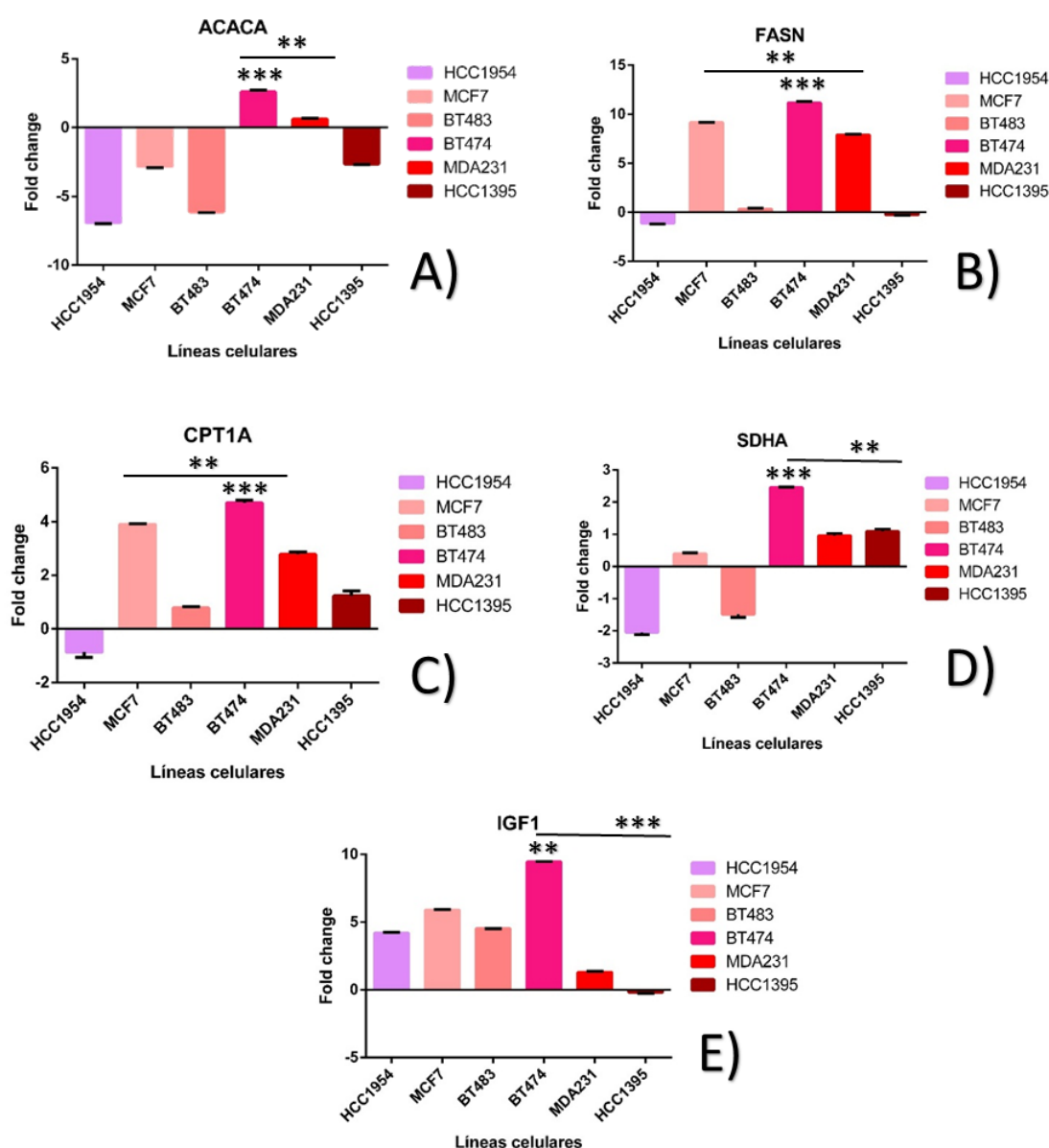


Fig. 12 Gráficas de expresión de *IGF1R*, *ITPR1*, *PGC1α*, *ACADM* y *ACOX1* en la línea celular BT483. Se grafican en el eje “Y” los valores de Fold Change y en el eje de las “X” las líneas celulares analizadas. Normalización con línea celular MCF-12A y gen endógeno *GAPDH*. Los datos mostrados son resultado de experimentos por triplicado. Barras de error: desviación estándar. La significancia estadística fue determinada por la prueba T de student: *P<0.05, **P<0.001 y ***P<0.0001.

La línea celular BT474 de subtipo Luminal B de tumor primario presentó una mayor expresión de los genes *ACACA*, *SDHA* ($P < 0.0001$, t de student), *IGF1*, *FASN* y *CPT1A* ($p < 0.001$) respecto a las otras líneas analizadas (Figura 13).



En la línea celular de CMTN derivada de tumor primario HCC1395 se observó una mayor expresión de los genes asociados a función mitocondrial *TFAM* ($p<0.001$) y *COX4i1* ($p<0.0001$) (Figura 14).

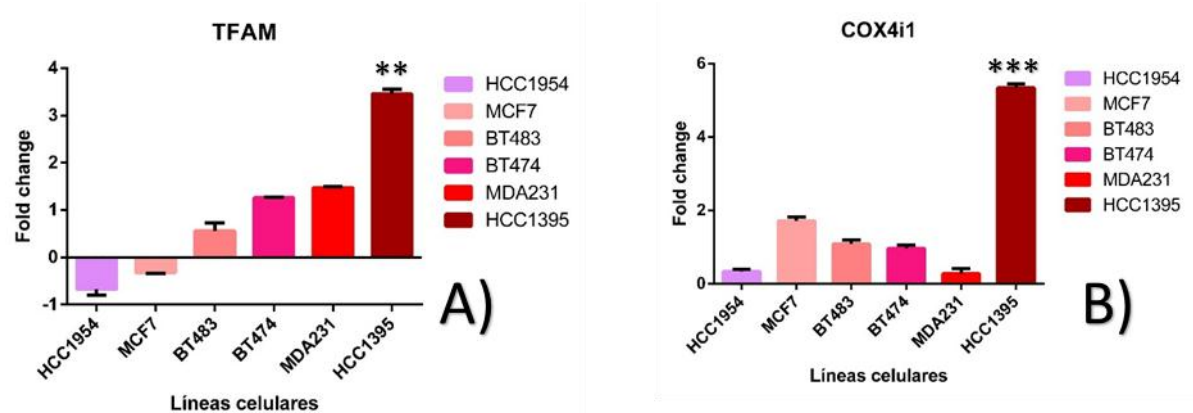


Fig. 14 Gráficas de expresión de *TFAM* y *COX4i1* en la línea celular HCC1395. Se grafican en el eje "Y" los valores de Fold change y en el eje de las "X" las líneas celulares analizadas. Normalización con línea celular MCF-12A y gen endógeno *GAPDH*. Los datos mostrados son resultado de experimentos por triplicado. Barras de error: desviación estándar. La significancia estadística fue determinada por la prueba T de student: * $P<0.05$, ** $P<0.001$ y *** $P<0.0001$.

En la línea celular metastásica MDA-MB-231 de CMTN se observó la sobre-expresión de los genes *MFN2*, *ATF4* ($p<0.05$), *HSPA5*, *SCD*, *CHOP*, *INS* ($p<0.001$), *GLUT1*, *IRS1* y *LIPE* ($p<0.0001$) comparado con el resto de las líneas celulares analizadas en el ensayo (Figura 15 y 16).

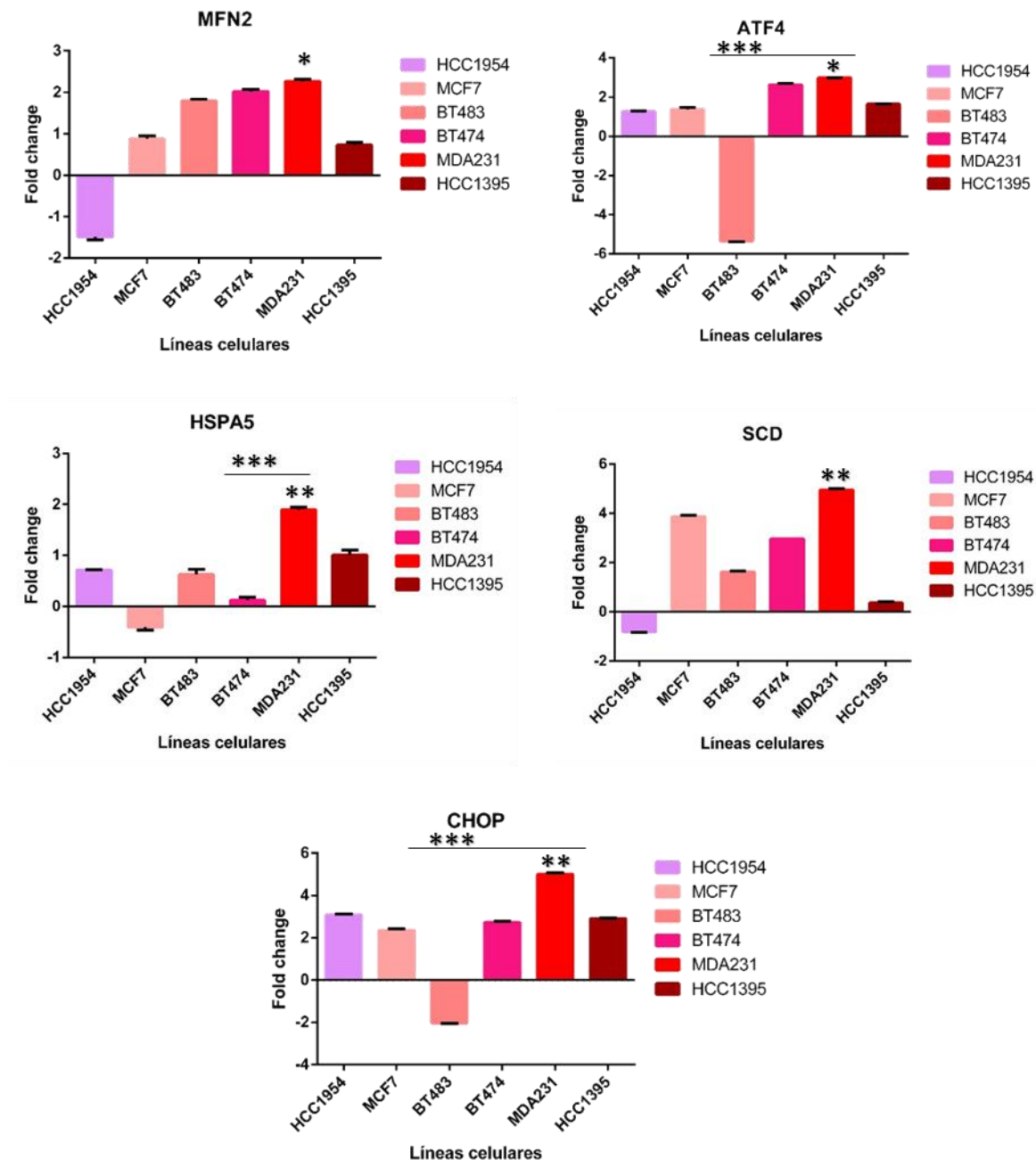


Fig. 15 Gráficas de expresión de *MFN2*, *ATF4*, *HSPA5*, *SCD* y *CHOP* en la línea celular MDA-MB-231. Se grafican en el eje "Y" los valores de Fold change y en el eje de las "X" las líneas celulares analizadas. Normalización con línea celular MCF-12A y gen endógeno *GAPDH*. Los datos mostrados son resultado de experimentos por triplicado. Barras de error: desviación estándar. La significancia estadística fue determinada por la prueba T de student: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ y *** $P < 0.0001$.

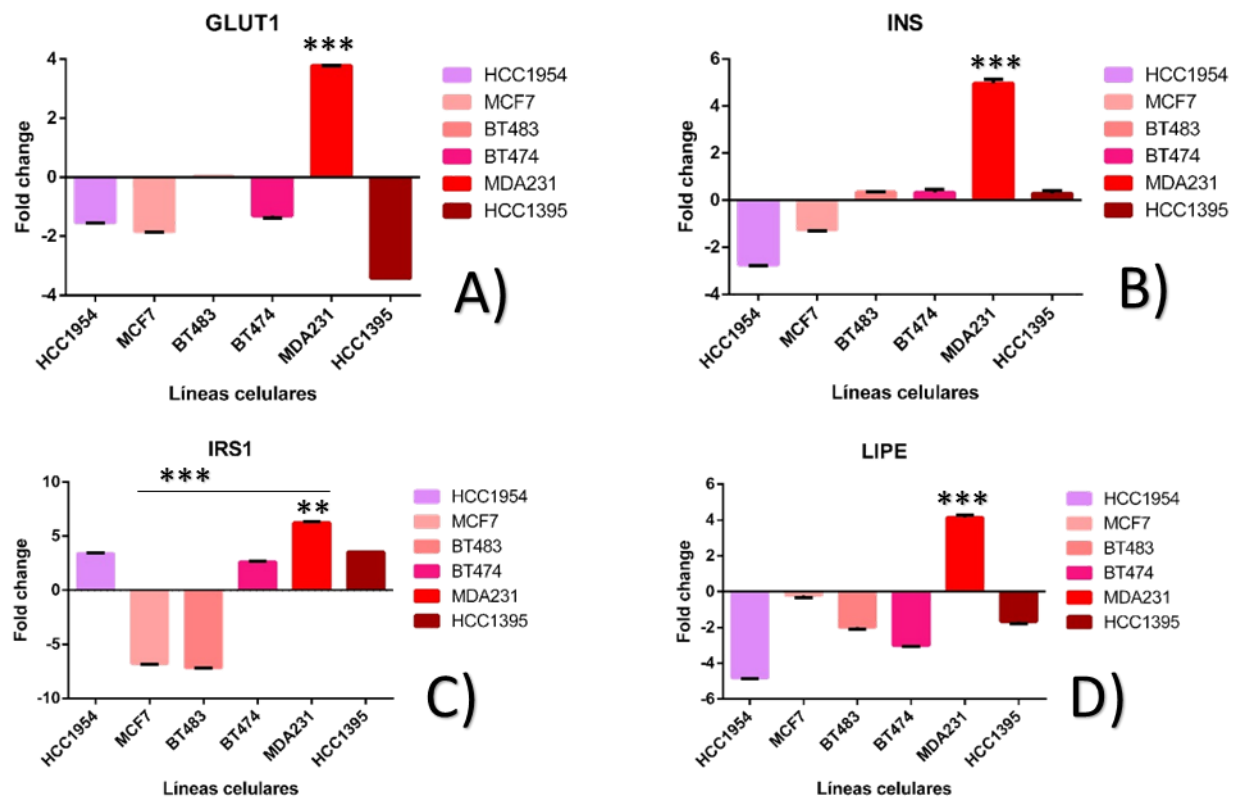


Fig. 16 Gráficas de expresión de GLUT1, INS, IRS1 y LIPE en la línea celular MDA-MB-231. Se grafican en el eje “Y” los valores de Fold change y en el eje de las “X” las líneas celulares analizadas. Normalización con línea celular MCF-12A y gen endógeno *GAPDH*. Los datos mostrados son resultado de experimentos por triplicado. Barras de error: desviación estándar. La significancia estadística fue determinada por la prueba T de student: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ y *** $P < 0.0001$.

6.4 Análisis de expresión en tejido sano de mama.

Solo se contó con una muestra de tejido sano de mama y se realizó el análisis de expresión por qPCR utilizando el agente intercalante SybrGreen. El ensayo fue realizado para los 21 genes ya que se contó con suficiente cantidad de RNA para realizar el experimento y los resultados se muestran en la Figura 17.

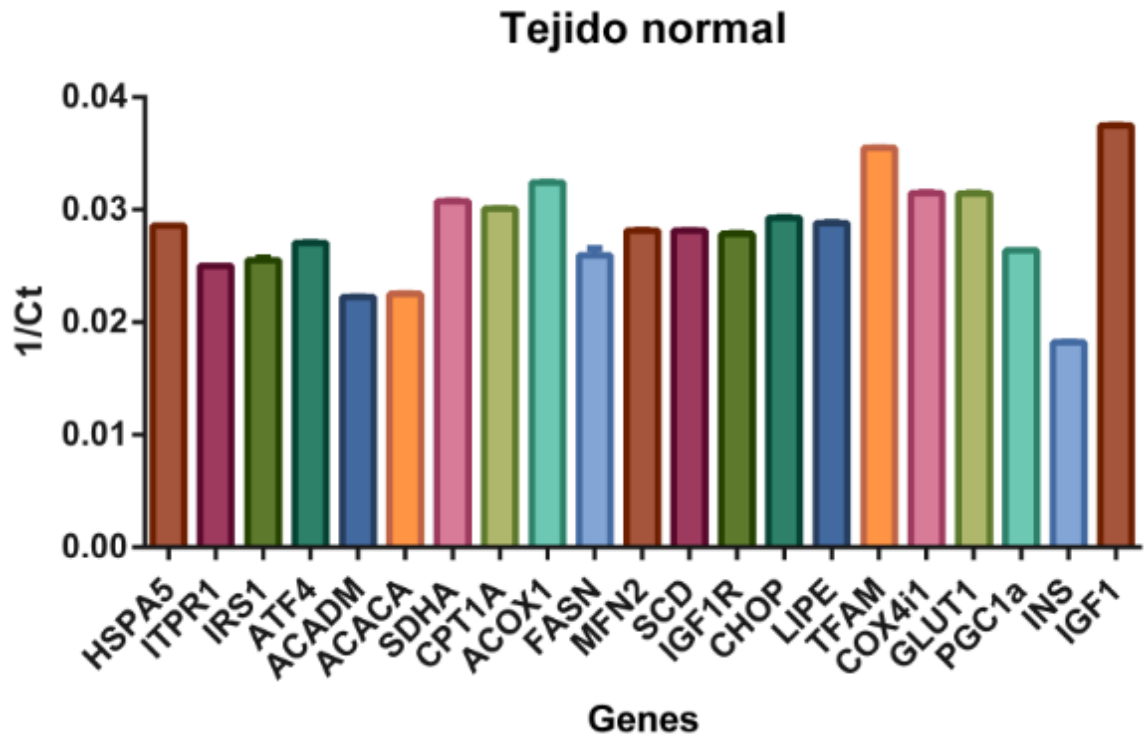


Fig. 17 Gráficas de expresión de los 21 genes en tejido sano de mama. Se grafican en el eje “Y” los valores del inverso del Ct y en el eje de las “X” los genes analizados. Normalización con gen endógeno *GAPDH*. Los datos mostrados son resultado de experimentos por triplicado. Barras de error: desviación estándar.

6.5 Análisis de expresión en tejido tumoral de CMTN y CMnTN.

Se extrajo el RNA de 17 biopsias de tumor de CMTN y de 16 biopsias de tumor de CMnoTN, fueron cuantificadas por espectrofotometría obteniéndose valores entre 15 a 366ng/μL de RNA total. Posteriormente se realizó la retrotranscripción a cDNA partiendo de 100ng de RNA.

Para las muestras tumorales fueron analizados solamente 6 genes *GLUT1*, *INS*, *IRS1*, *LIPE*, *TFAM* y *COX4i1* que fueron los más diferencialmente expresados entre las líneas celulares de CMTN comparado con los demás subtipos.

Mediante la prueba estadística utilizada de Kolmogorov-Smirnov no se encontraron diferencias significativas entre los 2 grupos de estudio para ninguno de los 6 genes analizados (Figura 18).

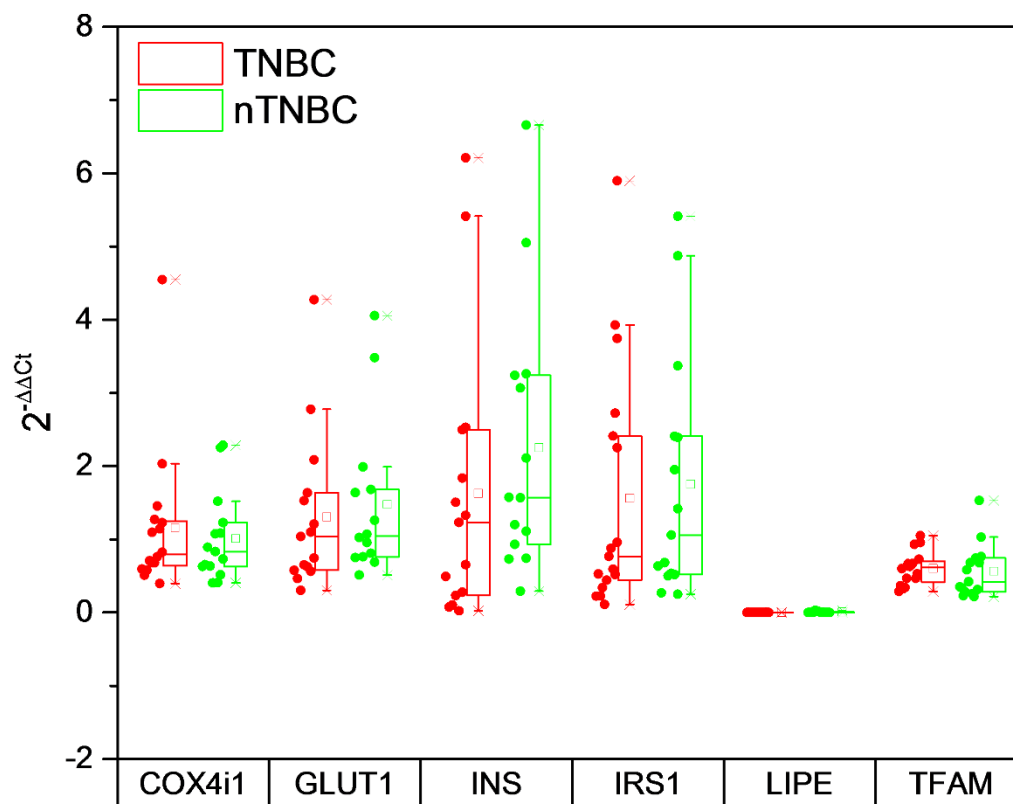


Fig. 18 Diagrama de “cajas y bigotes” representando la expresión de *COX4i1*, *GLUT1*, *INS*, *IRS1*, *LIPE* y *TFAM* en las muestras de tumor. Se grafican en el eje “Y” los valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ y en el eje de las “X” los genes analizados. Normalización con muestra de tejido sano de mama y gen endógeno *GAPDH*. Los datos mostrados son resultado de experimentos por triplicado. Barras de error: desviación estándar. La significancia estadística fue determinada por la prueba Kolmogorov-Smirnov con valores de $p < 0.05$ y $p < 0.01$.

6.6 Ensayo de inhibición de HMGA1 en las líneas celulares de CMTN.

Se realizó el ensayo de inhibición en las 2 líneas celulares de CMTN, HCC1395 derivada de tumor primario y MDA-231 derivada de metástasis. Se

pudo observar una mayor subexpresión del gen HMGA1 comparado con el control a las 48 horas mostrando un porcentaje de inhibición de 84% (Figura 19)

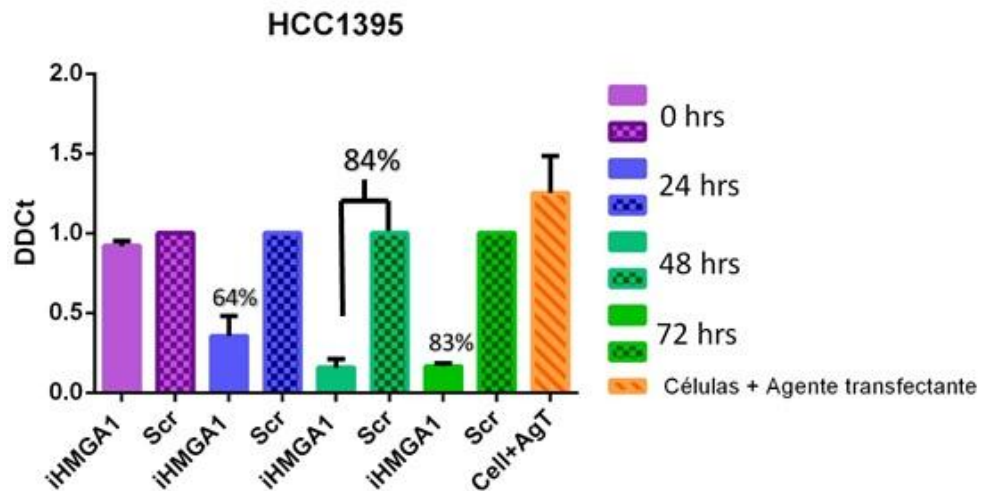


Fig. 19 Gráfica del porcentaje de inhibición de *HMGA1* en la línea HCC1395. Se realizó la medición a los tiempos 0, 24, 48 y 72 horas utilizándose como control el siRNA scramble.

Se realizó el procedimiento de forma similar para la línea celular MDA-231 donde también se pudo observar el mayor porcentaje de inhibición del gen *HMGA1* a las 48 horas con un 68% (Figura 20).

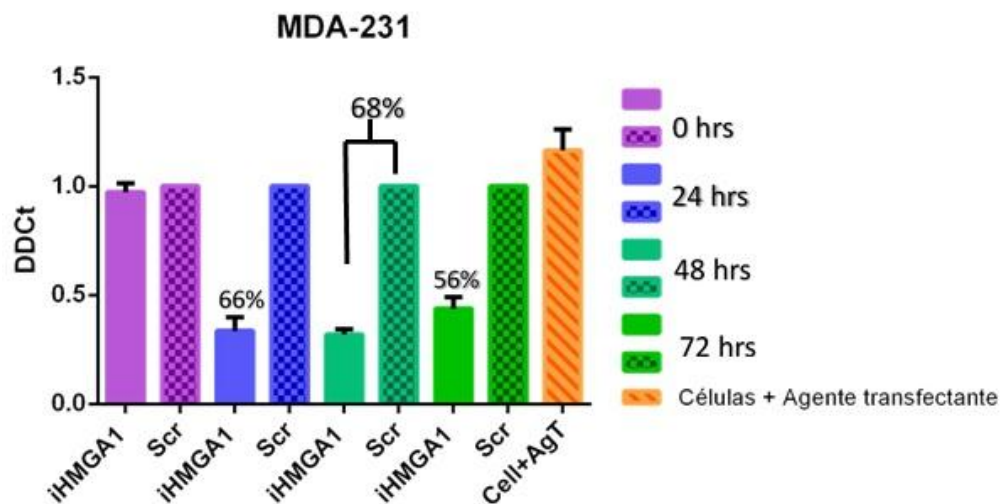


Fig. 20 Gráfica del porcentaje de inhibición de *HMGA1* en la línea MDA-231. Se realizó la medición a los tiempos 0, 24, 48 y 72 horas utilizándose como control el siRNA scramble.

6.7 Análisis del efecto de la inhibición del gen HMGA1 en líneas celulares de CMTN por microarreglos de expresión.

Después de realizarse la normalización correspondiente mediante el método RMA (Roboust Multi-array Average), los datos obtenidos por microarreglos se usaron para obtener un perfil de expresión genética diferencial al comparar entre la condición de inhibición de *HMGA1* contra el control para ambas líneas celulares de CMTN. En el caso de HCC1395 se observó la sobreexpresión de 17 genes y la subexpresión de 3 genes (Figura 21) donde los sobreexpresados están involucrados en procesos de proliferación celular, angiogénesis, regulación de la transcripción e inflamación y los subexpresados en la regulación de *c-myc*, ubiquitinación y organización del citoesqueleto (Tabla 10).

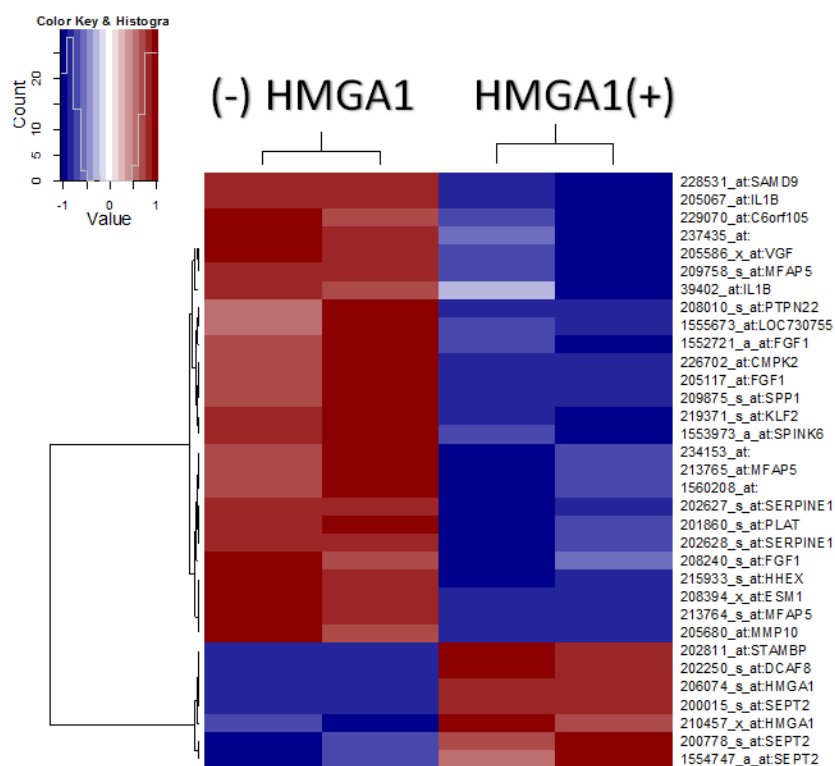


Fig. 21 “Heatmap” de la línea HCC1395 con (-HMGA1) y sin (+HMGA1) la inhibición de *HMGA1*. En color rojo se encuentran los genes sobreexpresados y en color azul los subexpresados.

Tabla 10 Genes desregulados en HCC1395 por la inhibición de *HMGA1*.

Gen	Nombre	Función
SAMD9	Sterile Alpha Motif Domain Containing 9	Proliferación y apoptosis, respuesta inflamatoria en lesiones. Blanco de la señalización de TNF-alfa.
IL1B	Interleukin 1-b	Proliferación, diferenciación y apoptosis.
ADTRP	Androgen Dependent TFPI Regulating Protein	Regula la expresión de genes asociados a la actividad anticoagulante del inhibidor TFPI en células endoteliales.
VGF	VGF Nerve Growth Factor Inducible	Involucrado en la regulación de interacciones célula-célula y en la generación de sinapsis.
MFAP5	Microfibrillar Associated Protein 5	Glicoproteína componente de las microfibras de la matriz extracelular.
PTPN22	Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 22	Involucrada en la regulación de CBL en la vía de señalización de células-T.
KRTAP2-3	keratin associated protein 2-3	Proteína asociada a la queratina, crecimiento de cabello.
FGF1	Fibroblast Growth Factor 1	Mitogénico, desarrollo embrionario, proliferación, angiogénico, TEM.
CMPK2	Cytidine/Uridine Monophosphate Kinase 2	Síntesis de dUTP y dCTP en mitocondria.
SPP1	Secreted Phosphoprotein 1	Involucrado en el anclaje de osteoclastos a la matriz mineralizada de hueso
KLF2	Kruppel-Like Factor 2	Factor de transcripción.
SPINK6	Serine Peptidase Inhibitor, Kazal Type 6	Actúa sobre las peptidasas kallikrein en piel.
SERPINE1	Serpin Family E Member 1	Inhibidor principal del activador de plasminógeno en tejido (tPA) y urokinasa (uPA).
PLAT	Plasminogen Activator, Tissue Type	Convierte la proenzima plasminógeno en plasmina. Remodelación de tejido y degradación, migración celular.
HHEX	Hematopoietically Expressed Homeobox	Factor de transcripción involucrado en procesos de desarrollo. Diferenciación hematopoyética.
ESM1	Endothelial Cell Specific Molecule 1	Involucrado en angiogénesis.
MMP10	Matrix Metalloproteinase 10	Involucrado en la degradación de la matriz extracelular en procesos normales como desarrollo embrionario, reproducción y remodelación de tejidos pero también en artritis y metástasis.
STAMBP	STAM Binding Protein	Señalización mediada por Citocinas en la inducción de MYC y progresión del ciclo celular.
DCAF8	DDB1 And CUL4 Associated Factor 8	Involucrada en la vía de ubiquitinación, sustrato receptor para el complejo de proteína-ubiquitina ligasa.
SEPT2	Septin 2	GTPasa de filamentos del citoesqueleto. Requerida para la organización de actina en el citoesqueleto, necesaria para mitosis.

* Los genes en negritas se encontraron sobreexpresados cuando se inhibió *HMGA1*.

Para la línea MDA-231 se siguió la misma metodología observándose la desregulación de un menor número de genes en comparación con la línea HCC1395 (Figura 22). El efecto de la inhibición de HMGA1 resultó en la sobreexpresión de solo un gen *PRRX1*, un co-activador transcripcional involucrado en diversos procesos entre ellos la TEM (ver Tabla 11) y en la subexpresión de 6 genes involucrados en la reorganización del citoesqueleto y proliferación celular.

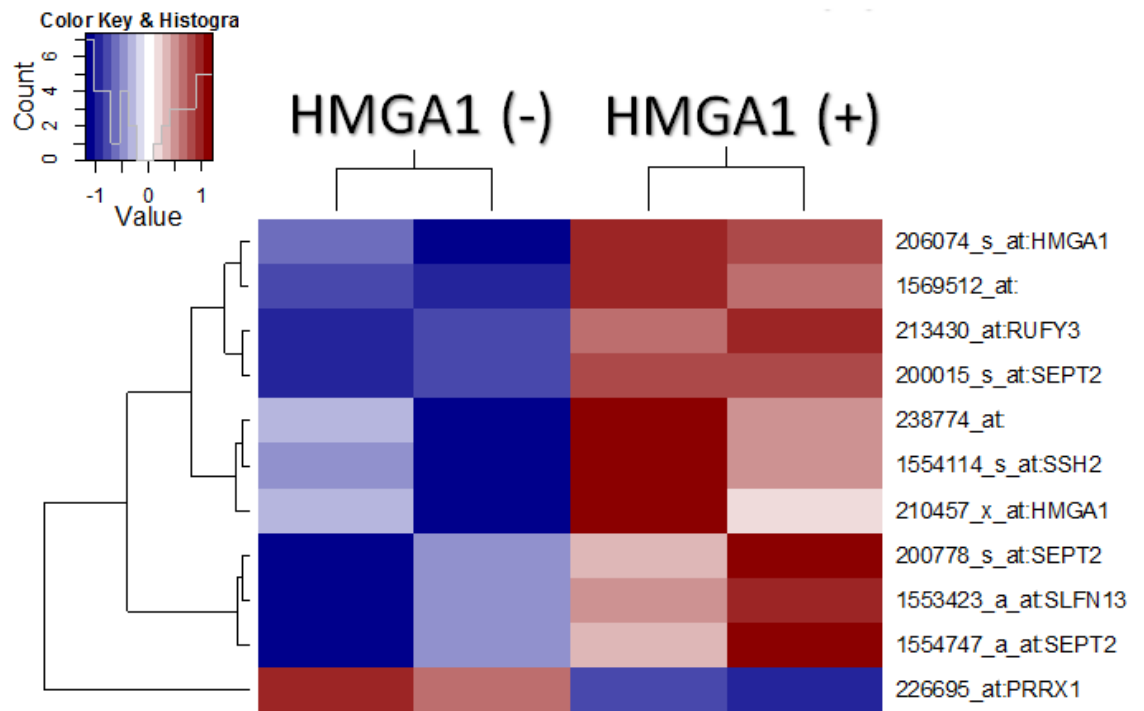


Fig. 22 Heatmap de la línea MDA-231 con (-HMGA1) y sin (+HMGA1) la inhibición de *HMGA1*. En color rojo se encuentran los genes sobreexpresados y en color azul los subexpresados.

Tabla 11 Genes desregulados en MDA-231 por la inhibición de *HMGA1*.

Gen	Nombre	Función
PRRX1	Paired Related Homeobox 1	Regulador transcripcional de la creatina kinasa de músculo. Se une a regiones ricas en A/T en secuencias enhancer. Su inhibición promueve la TEM.
RUFY3	RUN And FYVE Domain Containing 3	Generación de polaridad neuronal y crecimiento de axones. Promueve la metástasis dependiente de PAK1 en cáncer gástrico.
SEPT2	Septin 2	GTPasa de filamentos del citoesqueleto. Requerida para la organización de actina en el citoesqueleto, necesaria para mitosis.
SSH2	Slingshot Protein Phosphatase 2	Fosfatasa que regula la dinámica de los filamentos de actina.
SLFN13	Schlafen Family Member 13	Regula el crecimiento y desarrollo de células-T.
SVIL	Supervillin	Asociada con filamentos de actina y membrana plasmática, link entre el citoesqueleto y la membrana.
KANSL1	KAT8 Regulatory NSL Complex Subunit 1	Parte del complejo NSL involucrado en la acetilación de la histona 4 en residuos de lisina. Regulación de la transcripción.

* Los genes en negritas se encontraron sobreexpresados cuando se inhibió *HMGA1*.

7. DISCUSIÓN

7.1 Diferencias de expresión en líneas celulares de cáncer de mama.

En este trabajo se analizó un grupo de 21 genes (Tabla 5) relacionados al metabolismo celular, esto basado en los resultados del análisis de interacción de los genes de la firma genómica obtenida por nuestro grupo de investigación. Como un tamizaje primario, el análisis se realizó en un grupo de líneas celulares de diferentes tipos de CM. Los resultados obtenidos de este tamizaje mostraron una diferencia en los perfiles de expresión de los 21 genes analizados dependiendo el subtipo de CM, corroborando lo observado por otros grupos de investigación ^{56, 75}.

Aparentemente los mecanismos metabólicos que pueden ser utilizados por las células para la obtención de energía son distintos dependiendo el subtipo de cáncer. Los resultados obtenidos del ensayo con las líneas celulares muestran un patrón de expresión diverso, los subtipos luminales presentan una mayor expresión de genes relacionados al metabolismo de lípidos como *ACADM*, *ACOX1*, *CPT1A*, *FASN* y *ACACA* comparado con los demás subtipos. Kim y colaboradores⁵⁶ realizaron un análisis de expresión de proteínas del metabolismo de lípidos en líneas celulares de distintos subtipos de CM y reportaron una mayor expresión de *PLIN1*, *CPT-1A*, *FASN*, *FABP4*, y *ACOX-1* en el subtipo HER2+ mediante Western Blot. También el grupo de investigación de Jin Q⁷⁶ reportó un papel importante de *FASN* en el subtipo HER2+ describiendo que la sobreexpresión de *HER2* incrementa la traducción de *FASN* y la sobreexpresión de *FASN* incrementa de forma importante la señalización por HER2 dando como

resultado una alta proliferación celular. De forma contradictoria Viñas y colaboradores⁷⁷ en 2012 reportaron que la proteína *FASN* se encuentra sobreexpresada en CMTN mediante un análisis en 30 tumores de pacientes por inmunohistoquímica donde el 66.6% presentó una alta expresión y un 33.3% una expresión moderada, sin embargo ningún tumor de CMTN presentó negatividad para esta proteína.

La inhibición de *FASN* ya ha sido reportada y se ha observado que disminuye de forma importante el crecimiento tumoral, además, moléculas que inhiben enzimas relacionadas a la síntesis de ácidos grasos como *ACACA* se han sugerido para terapia en CM⁷⁵, sin embargo se requieren más estudios para definir el estado de expresión de genes asociados a metabolismo de lípidos acorde al subtipo de CM.

En nuestro experimento, empleando las líneas celulares de CMTN, demostramos una sobreexpresión de la mayoría de genes mitocondriales y de metabolismo de carbohidratos incluidos, *TFAM*, *MFN2*, *COX4i1*, *ATF4*, *HSPA5*, *SCD*, *CHOP*, *GLUT1*, *INS*, *IRS1* y *LIPE*. Pudieron observarse distintos perfiles de expresión dentro del mismo grupo triple negativo en las 2 líneas celulares teniendo una mayor expresión de genes de metabolismo mitocondrial *TFAM* y *COX4i1* en la línea HCC1395 derivada de tumor primario y una mayor expresión de genes asociados a metabolismo de carbohidratos *GLUT1*, *INS*, *IRS1* y *LIPE* en la línea MDA-231 derivada de metástasis permitiéndonos establecer una firma de 6 genes nunca antes descrita (Figura 23) que permite diferenciar entre 2

estadios de la enfermedad (tumor primario y tumor metastásico) en líneas celulares de CMTN.

Genes	<u>Tumor primario</u> HCC1395 Valores de Fold Change:	<u>Metástasis</u> MDA-231 Valores de Fold Change:
<i>GLUT1</i>	-3.42	↑ 1.80
<i>INS</i>	0.29	↑ 4.96
<i>IRS1</i>	3.52	↑ 5.30
<i>LIPE</i>	-1.66	↑ 4.15
<i>TFAM</i>	↑ 3.50	2
<i>COX4i1</i>	↑ 5.34	0.27

Fig. 23 Perfil de expresión diferencial en las líneas de CMTN. Se muestran los valores de Fold Change de cada uno de los genes utilizando como referencia a la línea de mama normal MCF-12A. Los valores de expresión de estos 6 genes fueron mayores comparados con los valores de los demás subtipos de CM analizados.

Ya ha sido reportada la expresión diferencial de genes dependiendo el estadio del cáncer, en etapa inicial de tumor primario o en etapas avanzadas donde ya existe invasión y metástasis. Jung y colaboradores⁷⁵ encontraron diferencias en la expresión de genes entre 2 estadios de la enfermedad mediante ensayos de inmunohistoquímica observando la sobreexpresión de *FASN* y *ACOX1* en metástasis cerebral de pacientes con tumores de mama subtipo HER2+.

Pudimos observar una sobreexpresión de genes asociados a función mitocondrial *TFAM* y *COX4i1* en la línea derivada de tumor primario. Según la teoría de Warburg, las células cancerosas presentan una disminución en la fosforilación oxidativa y un incremento en la glicólisis aún en presencia de

suficiente oxígeno para la respiración aeróbica, conocido como “el efecto Warburg”⁷⁸. Sin embargo, Sotgia y colaboradores⁷⁹ establecieron un nuevo paradigma “el efecto Warburg-reversa” gracias a sus resultados donde pudieron observar que en CM las células del estroma tumoral presentan disfunción mitocondrial dando origen a un metabolismo glicolítico produciendo metabolitos de alta energía como L-lactato y cetonas que son utilizadas por las células cancerosas vecinas que son ricas en mitocondrias completamente funcionales que llevan a cabo la fosforilación oxidativa para suplir sus altos requerimientos energéticos⁷⁹.

Pudimos observar una alta expresión de genes involucrados en función mitocondrial en células de CMTN en estadio primario mostrando para estas células un metabolismo tipo “Warburg-reversa”.

Owens y colaboradores⁸⁰ reportaron una reducción significativa en la fosforilación oxidativa en líneas celulares de CM metastásicas y con una alta agresividad. Los datos obtenidos en su ensayo mostraron una correlación entre los defectos de la fosforilación oxidativa con la severidad del CM donde la línea de CMTN metastásica MDA-231 contenía la mayor cantidad de aberraciones en la actividad oxidativa mitocondrial⁸⁰, indicando que en etapas avanzadas del cáncer comienzan a presentarse aberraciones. En nuestro ensayo se observó la sobreexpresión de la Citocromo C oxidasa (*COX4i1*) y el factor de transcripción mitocondrial (*TFAM*, el cual es necesario para mantener la funcionalidad de la cadena respiratoria mitocondrial) en la línea HCC1395 de CMTN derivada de

tumor primario sugiriendo que al parecer en las etapas iniciales del cáncer la fosforilación oxidativa es esencial.

El gen *COX4i1* se observó subexpresado en CM subtipo luminal por Finetti y colaboradores⁸¹, sin embargo en nuestro estudio encontramos que este gen se sobreexpresa en el subtipo triple negativo.

Como se mencionó en la introducción, el cambio metabólico de las células de fosforilación oxidativa a glicólisis aún en presencia de oxígeno es común en las células cancerosas, esto conduce a un microambiente ácido donde las células se vuelven resistentes a los niveles bajos de pH lo que les confiere ventajas en el crecimiento permitiendo así una división descontrolada y progresión a la invasión.

Respecto a esto, nosotros pudimos observar la sobreexpresión del gen *GLUT1* en la línea derivada de metástasis, esta sobreexpresión ya ha sido reportada en CMTN por Kim y colaboradores⁶² en 2013 donde realizaron ensayos mediante inmunohistoquímica en tumores y reportaron una sobreexpresión de *GLUT1* en CMTN en comparación con los demás subtipos de CM. Al encontrarse este gen sobreexpresado aumenta también la actividad metabólica asociada al incremento de la transferencia de glucosa al interior de la célula lo que conduce a la sobreproducción de lactato y a un ambiente de acidosis intracelular. Como ya se ha mencionado anteriormente, el subtipo triple negativo se caracteriza por un alto grado histológico, un comportamiento biológico agresivo y un mal pronóstico, compartiendo estas características con tumores que presentan alta actividad metabólica⁶².

Existe gran cantidad de evidencia que demuestra que las condiciones de hipoxia inhiben la fosforilación oxidativa y estimulan la glicólisis (efecto Warburg) relacionando este proceso directamente con los transportadores de glucosa (GLUTs). *GLUT1* ha sido clasificado como marcador de metástasis en cáncer de laringe ya que activa vías como PI3K/Akt y también induce la TEM incrementando la capacidad de las células para la invasión mediante la regulación de la actividad de metaloproteinasas de la matriz⁸². La sobreexpresión de este gen ya ha sido asociada a un alto grado histológico y a una alta proliferación⁶¹ las cuales son características básicas de un subtipo agresivo como es el CMTN.

7.2 Expresión en tejido tumoral de mama.

Los casos incluidos en el presente estudio fueron determinados por conveniencia. La mayoría de las pacientes al momento de la toma de biopsia presentaron sobrepeso y niveles altos de glucosa y colesterol en sangre (ver Tabla 9), padeciendo un metabolismo energético alterado.

Se realizó el ensayo de expresión de los 6 genes seleccionados en tejido tumoral de mama y se analizaron por la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov debido a que el número de muestras por gen fue diferente y el tamaño muestral pequeño. Esta prueba es sensible a la forma, posición y dispersión de las distribuciones. Cuando se tienen dos poblaciones independientes de distribución desconocida y se quiere contrastar si sus distribuciones son iguales (homogeneidad) o son estadísticamente diferentes se utiliza KS para dos muestras⁸³ y en este caso se analizaron con valores de $p < 0.01$ y $p < 0.05$ sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Se pudo

notar cierta tendencia a una mayor expresión en el grupo de los tumores triple negativo (ver Figura 18) en los genes *GLUT1*, *IRS1* y *COX4i1* sin embargo no fueron significativas, esto probablemente debido a que la “n” del grupo de estudio fue muy baja por lo que será conveniente ampliar el número de muestras para poder encontrar diferencias estadísticamente significativas

7.3 Efecto de la inhibición de *HMGA1* en CMTN.

El gen *HMGA1* codifica para una proteína que actúa como regulador transcripcional, contiene dominios de unión a regiones ricas en A-T en el DNA y regula la organización del complejo de transcripción⁶⁹.

Mediante la inhibición de este gen en líneas celulares se ha reportado una reducción importante de la proliferación y capacidad metastásica^{84, 71}, de forma similar en ensayos *in vivo* donde se inocularon ratones con células que presentaban inhibición de *HMGA1* por iRNA pudieron observar una reducción en la agresividad y capacidad de tumorigénesis⁸⁵.

HMGA1 es un master regulador de la TEM en las células de CMTN ya que regula genes que están relacionados a la proliferación celular, al desarrollo y directamente con TEM⁸⁶, sin embargo no se ha asociado directamente con genes de metabolismo.

Brunetti y colaboradores reportaron que *HMGA1* es indispensable para la correcta transcripción del gen *IRS1*⁷², este es un gen que pudimos observar sobreexpresado en las líneas celulares de CMTN por lo que se realizó la

inhibición de *HMGA1* para analizar si está involucrado en la regulación de genes asociados al metabolismo.

El efecto de la inhibición en la línea celular HCC1395 de CMTN derivada de tumor primario se observó en una sobreexpresión de los genes *SAMD9*, *IL1B*, *ADTRP*, *VGF*, *MFAP5*, *PTPN22*, *KRTAP2-3*, *FGF1* y *CMPK2* y una subexpresión de los genes *STAMBP*, *DCAF8* y *SEPT2* (Figura 21). Utilizando la plataforma bioinformática en línea DAVID “Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery” se realizó un análisis funcional *in silico* donde los genes se agruparon de acuerdo a su función o ruta metabólica donde participan. Entre las funciones de los genes sobreexpresados destacan la relación con la proliferación celular, angiogénesis, regulación de la transcripción, desarrollo del sistema nervioso, inflamación y remodelación de la matriz extracelular. Para el caso de los genes subexpresados, estos presentan relación con la regulación ciclo celular, del citoesqueleto y ubiquitinación (Tabla 10).

El efecto de la inhibición en la línea celular de CMTN metastásica MDA-231 resultó en la expresión diferencial de un menor número de genes en comparación con la línea derivada de tumor primario (Figura 22). Se observó la sobreexpresión de solo un gen *PRRX1* el cual actúa como un regulador transcripcional de la enzima creatina quinasa muscular la cual cataliza la conversión de creatina. Este factor de transcripción, al igual que *HMGA1*, se une a regiones ricas en A-T en las regiones promotoras de algunos genes. La inhibición de *HMGA1* también tuvo un efecto en la subexpresión de un mayor número de genes *RUFY3*, *SEPT2*,

SSH2, *SLFN13*, *SVIL* y *KANSL1* involucrados en procesos como regulación de la transcripción, del citoesqueleto y desarrollo neuronal (Tabla 11).

El gen *RUFY3* tiene un papel importante en la generación de la polaridad neuronal y crecimiento de axones, sin embargo también se ha reportado que promueve la migración e invasión celular dependiente de *PAK1* en cáncer gástrico⁸⁷. Variaciones en la regulación de la polimerización de los filamentos de actina son responsables de la formación de estructuras protrusivas como filopodios, lamelipodios e invadopodios que son esenciales para el movimiento e invasión de las células tumorales. Wang y colaboradores⁸⁷ mediante ensayos de inmunofluorescencia en las células SGC-7901 de cáncer gástrico pudieron observar la localización de *RUFY3* en invadopodios ricos en F-actina induciendo la formación de estas estructuras protrusivas para la invasión. Se ha reportado que en pacientes con CMTN es común observar metástasis es en cerebro⁸⁸, de igual forma los pacientes con cáncer gástrico en etapas avanzadas (TNM III y TNM IV) donde ya se presenta metástasis distante, por lo que probablemente exista alguna relación del gen *RUFY3* con este proceso debido a que se encuentra expresado en la línea metastásica pero no en la de tumor primario, sin embargo más estudios deben realizarse para poder encontrar una relación.

El gen *PRRX1* también se vio afectado por el silenciamiento de *HMGA1* encontrándose sobreexpresado mientras que en condiciones normales en la línea metastásica de CMTN se observó subexpresado. Este gen codifica para un factor de transcripción que, al igual que *HMGA1*, se une a regiones ricas en A-T en el DNA y su inhibición se ha asociado a la TEM confiriendo a las células

capacidades de migración e invasión celular⁸⁹. Ocaña y colaboradores⁸⁹ en el 2012 realizaron un ensayo *in vitro* en células de CM donde pudieron observar la subexpresión del gen *PRRX1* en las líneas invasivas MDA-231, MCF7, MDA-453 y SKBR3 en comparación con líneas no metastásicas donde la expresión fue mayor. También realizaron ensayos con la línea BT-549 de CM donde se inhibió *PRRX1* por iRNA para posteriormente ser inyectadas en ratones inmunocomprometidos. En los ratones donde se inyectaron las células control no se observó metástasis, sin embargo en los ratones que fueron inoculados con las células donde se inhibió *PRRX1* presentaron metástasis en pulmones.

Los procesos de invasión y diseminación durante la progresión del cáncer se han asociado con la TEM, que dota a las células con capacidades invasivas y propiedades de células madre necesarias para iniciar la formación de un tumor secundario. Sin embargo, no está completamente claro cómo estas células migratorias colonizan órganos distantes. Con base a los resultados obtenidos de los microarreglos de expresión pudimos observar que al parecer *HMGA1* es el que regula la inhibición del gen *PRRX1* para permitir la metástasis, al menos en CMTN, lo cual ha sido descrito antes. La mayoría de los genes subexpresados en la línea metastásica por efecto de la inhibición de *HMGA1* resultaron ser genes relacionados con la regulación y organización del citoesqueleto y proliferación celular.

Para finalizar se realizó el análisis e integración de los resultados obtenidos en este trabajo donde revisamos las funciones de cada gen seleccionado en CMTN y si se encontraban en la misma ruta metabólica, si actuaban en conjunto

o si presentaban algún tipo de relación entre ellos. Pudimos concluir que *HMGA1* regula positivamente genes asociados a la TEM así como al receptor de la insulina⁷² que al ser activado por alguno de sus sustratos (por ejemplo insulina) enciende la vía de PI3K que activa a *AKT* que, entre otras cosas, induce la translocación de GLUT1 a la membrana celular para permitir la entrada de glucosa a la célula⁹⁰. En nuestro ensayo pudimos observar la sobreexpresión de *GLUT1* en la línea celular MDA-231 derivada de metástasis demostrando un metabolismo acelerado para CMTN. Corriente abajo de la cascada de señalización *AKT* activa a *LIPE*⁹⁰ (sobreexpresado en CMTN) dando inicio a la lipólisis convirtiendo los lípidos de la dieta en ácidos grasos y glicerol para cubrir las necesidades energéticas de la célula. *IRS1* también enciende la vía de RAS que induce la transcripción y proliferación celular, *PAK1* enciende la misma vía⁹¹ y actúa en conjunto con *RUFY3* sobreestimando su actividad para inducir cambios en la estructura de los filamentos de actina para la formación de invadopodios confiriéndole a las células un fenotipo invasivo⁸⁷ y por último, *HMGA1* pareciera ser el responsable de regular la inhibición de *PRRX1* para promover así la metástasis tumoral (Figura 24).

Con base a los resultados obtenidos en el presente proyecto proponemos que *HMGA1* regula genes asociados al metabolismo para acelerar la proliferación y crecimiento celular y también regula genes involucrados en la organización del citoesqueleto induciendo la TEM, promoviendo de esta forma la invasión a otros tejidos y la progresión del cáncer.

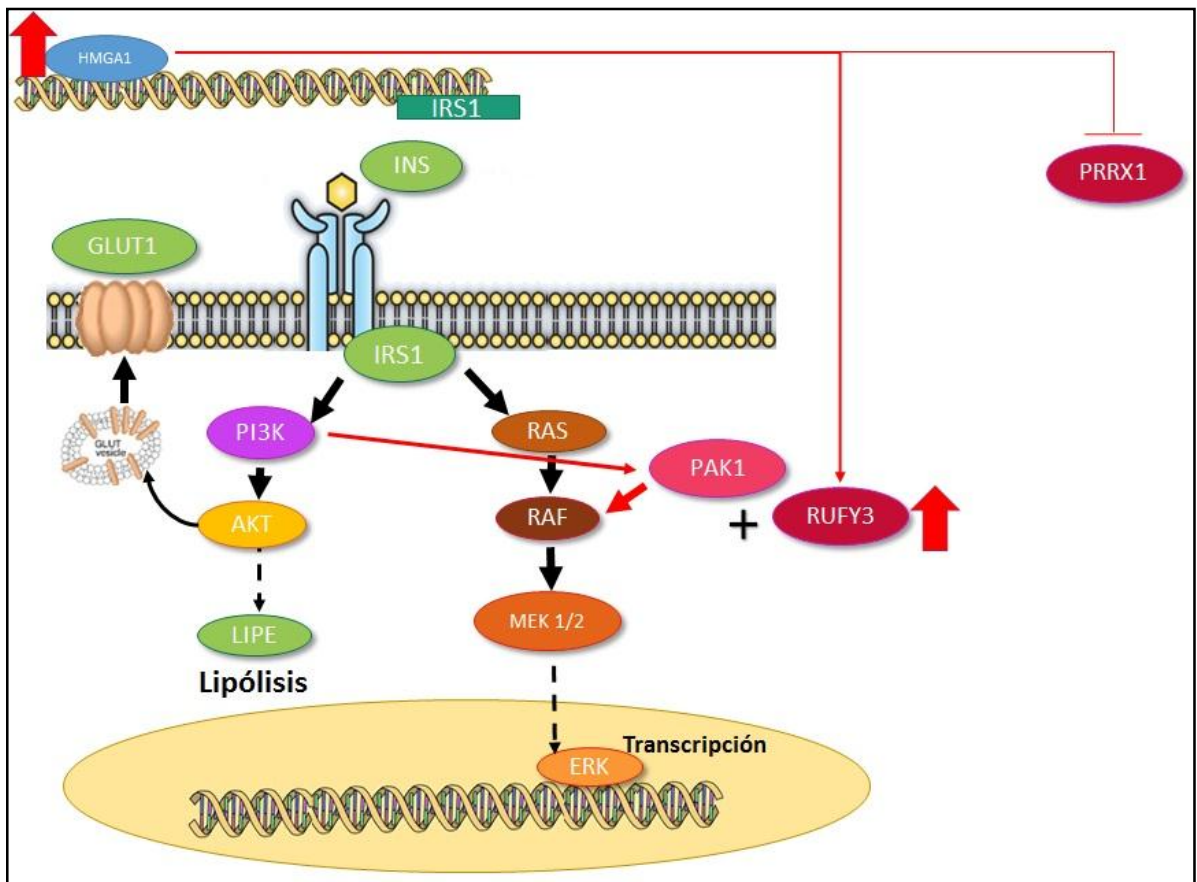


Fig. 24 Esquema de la integración de los mecanismos regulados por *HMGA1*.

8. CONCLUSIONES

En el presente estudio se realizó un análisis de expresión de genes candidatos importantes para el metabolismo en líneas de CM de distintos subtipos, biopsias de tumores de mama y la inhibición del gen *HMGA1* en líneas celulares de CMTN. Se lograron identificar diferentes patrones de expresión de los genes analizados, la mayoría de los genes asociados a metabolismo de lípidos presentaron una mayor expresión en los subtipos Luminales (A y B) y genes asociados a función mitocondrial y metabolismo de carbohidratos al subtipo Triple Negativo. Se obtuvo una firma de 6 genes que permiten diferenciar entre dos estadios de la enfermedad en líneas celulares de CMTN (tumor primario y metástasis) nunca antes descrita. Los genes afectados por el silenciamiento de *HMGA1* están directamente relacionados con la regulación y organización del citoesqueleto y también con la TEM. En la firma genómica obtenida por nuestro grupo de investigación, *HMGA1* presentó altos niveles de sobreexpresión en los tumores de las pacientes con CMTN y con base a los resultados obtenidos en el presente proyecto, proponemos que *HMGA1* regula genes asociados al metabolismo para acelerar la proliferación y crecimiento celular y también regula genes encargados de la organización del citoesqueleto promoviendo la TEM, entre ellos a *PRRX1*. Nunca se ha relacionado el papel de *HMGA1* en la regulación de la inhibición de *PRRX1* para promover la TEM en CMTN. La regulación de *PRRX1* por *HMGA1* no ha sido descrita por lo que estos hallazgos son de suma importancia para entender los mecanismos que confieren la agresividad y capacidad metastásica del CMTN.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. WHO | Breast cancer: prevention and control. *WHO* (2016).
2. INEGI. ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL DE LA LUCHA CONTRA EL CÁNCER DE MAMA; DATOS NACIONALES 2015.
3. Secretaría de Salud. Panorama epidemiológico del cáncer. Datos nacionales, 2015. *Boletín epidemiológico* **32**, (2015).
4. National Cancer Institute. Breast Cancer - National Cancer Institute. Available at: <http://www.cancer.gov/types/breast>.
5. Winslow, T. Anatomy of the female breast. *National Library of Medicine - PubMed Health* (2011). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0021901/?figure=1>.
6. Siu, A. L. Screening for Breast Cancer. *Ann. Intern. Med.* **164**, 279–96 (2016).
7. Cazares Flores, C., Gabriela, G. P. E., Díaz Amezcua, L. & de Alba Ramírez, V. Factores de riesgo para el cáncer de mama en México : revisión de estudios en poblaciones mexicanas y México-americanas. *CES Salud Pública* **5**, 50–58 (2014).
8. OMS. OMS | Cáncer de mama: prevención y control. *WHO* (2014).
9. Del Socorro, M. *et al.* Frecuencia de factores de riesgo de cáncer de mama. *Ginecol Obs. Mex* **76**, 667–72 (2008).
10. Breast Cancer. Factores de riesgo del cáncer de mama. Available at: http://www.breastcancer.org/es/sintomas/cancer_de_mama/riesgo/factores.
11. Romieu, I., Hernandez-Avila, M., Lazcano, E., Lopez, L. & Romero-Jaime, R. Breast Cancer and Lactation History in Mexican Women. *Am. J. Epidemiol.* **143**,
12. Danaei, G. *et al.* Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet (London, England)* **366**, 1784–93 (2005).
13. Asociación Mexicana de Mastología. Cáncer de Mama. (2015). Available at: <http://mastologia.org.mx/cancerdemama.html>.
14. National Cancer Institute. Tratamiento del cáncer de seno (PDQ®). (2014). Available at: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/seno/paciente/tratamiento-seno-pdq>.
15. Scholzen, T. & Gerdes, J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* **182**, 311–322 (2000).
16. Teresa, M. Marcadores de utilidad en cáncer mamario. *Cuad. Cir* **15**, 74–79 (2001).
17. Beckmann, M. W., Niederacher, D., Schnürch, H. G., Gusterson, B. A. & Bender, H. G. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *J. Mol. Med. (Berl)* **75**, 429–39 (1997).
18. Cheang, M. C. U. *et al.* Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **101**, 736–50 (2009).
19. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
20. Prat, A. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic

- subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* **12**, R68 (2010).
21. Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H. & Band, V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol. Ther.* **10**, 955–60 (2010).
 22. Imigo, F. G., Mansilla, E. S., Delama, I. G., Teresa Poblete, M. S. & Fonfach, C. Z. Clasificación molecular del cáncer de mama. *Cuad. Cir* (2011).
 23. Arrechea Irigoyen M, et al. Subtipos moleculares del cáncer de mama: implicaciones pronósticas y características clínicas e inmunohistoquímicas. *An. Sist. Sanit. Navar. An. Sist. Sanit. Navar* **34**, 219–233 (2011).
 24. International Breast Cancer Study Group. Tamoxifen After Adjuvant Chemotherapy for Premenopausal Women With Lymph Node-Positive Breast Cancer: International Breast Cancer Study Group Trial 13-93. *J. Clin. Oncol.* **24**, 1332–1341 (2006).
 25. Breast Cancer. Tratamiento y efectos secundarios en cáncer de mama. Available at: <http://www.breastcancer.org/es/tratamiento>.
 26. De Laurentiis, M. et al. Treatment of triple negative breast cancer (TNBC): current options and future perspectives. *Cancer Treat. Rev.* **36**, S80–S86 (2010).
 27. Dogu, G. G. et al. Triple-negative breast cancer: immunohistochemical correlation with basaloid markers and prognostic value of survivin. *Med. Oncol.* **27**, 34–9 (2010).
 28. Zaharia, M. & Gómez, H. Cáncer de mama triple negativo: una enfermedad de difícil diagnóstico y tratamiento. *Perú Med Exp Salud Pública*
 29. Millar, E. K. A. et al. Prediction of Local Recurrence, Distant Metastases, and Death After Breast-Conserving Therapy in Early-Stage Invasive Breast Cancer Using a Five-Biomarker Panel. *J. Clin. Oncol.* **27**, 4701–4708 (2009).
 30. Wu, Y., Sarkissyan, M., Elshimali, Y. & Vadgama, J. V. Triple negative breast tumors in African-American and Hispanic/Latina women are high in CD44+, low in CD24+, and have loss of PTEN. *PLoS One* **8**, e78259 (2013).
 31. Mendoza-del Solar, G. & Cervantes-Pacheco, F. Cáncer de mama triple negativo Triple negative breast cancer. *Rev Soc Peru Med Interna* **27**, 75–7875 (2014).
 32. Martinez, M. E. et al. Reproductive factors, heterogeneity, and breast tumor subtypes in women of mexican descent. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **22**, 1853–61 (2013).
 33. Lara-Medina, F. et al. Triple-negative breast cancer in Hispanic patients. *Cancer* **117**, 3658–3669 (2011).
 34. Daza, C. H. La obesidad: un desorden metabólico de alto riesgo para la salud. *Colomb. Med.* **33**, (2002).
 35. Aguilar Cordero, M. . J. et al. Obesidad y su implicación en el cáncer de mama. *Nutr. Hosp.* **26**, 899–903 (2011).
 36. Haakinson, D. J. et al. The impact of obesity on breast cancer: a retrospective review. *Ann. Surg. Oncol.* **19**, 3012–8 (2012).
 37. Rose, D. P., Gracheck, P. J. & Vona-Davis, L. The Interactions of Obesity, Inflammation and Insulin Resistance in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. **7**, 2147–68 (2015).
 38. Cell Signaling Technology. Insulin Receptor Signaling Pathway. (2014). Available at: <https://www.cellsignal.com/contents/science-pathway-research-cellular-metabolism/insulin-receptor-signaling-pathway/pathways-irs>.
 39. Nubiola, A., Ferrer, M. & Remolins, I. La asociación de hiperinsulinemia con riesgo

cardiovascular y cáncer plantea nuevos retos en el abordaje del paciente con diabetes tipo 2, insulinoresistente. *Hipertens. y riesgo Vasc.* (2014).
doi:10.1016/j.hipert.2014.06.001

40. Frasca, F. *et al.* The role of insulin receptors and IGF-I receptors in cancer and other diseases. *Arch. Physiol. Biochem.* **114**, 23–37 (2008).
41. Cusi, K., Consoli, A. & DeFronzo, R. A. Metabolic effects of metformin on glucose and lactate metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**, 4059–67 (1996).
42. Dowling R, *et al.* Changes in insulin receptor signaling underlie neoadjuvant metformin administration in breast cancer: a prospective window of opportunity neoadjuvant study. *Breast Cancer Res.* **17**, 32 (2015).
43. Dowling, R. J. O., Zakikhani, M., Fantus, I. G., Pollak, M. & Sonenberg, N. Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer Res.* **67**, 10804–12 (2007).
44. Wallace, D. C. Mitochondrial function and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **1** (2012).
doi:10.1038/nrc3365
45. De Ferranti, S., Mozaffarian, D. & Sánchez Rodríguez, M. A. La tormenta perfecta: obesidad, disfunción del adipocito y consecuencias metabólicas. *Vol. Abril-Junio* **34**, 95–108 (2009).
46. Gregor, M. F. & Hotamisligil, G. S. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J. Lipid Res.* **48**, 1905–1914 (2007).
47. Hosogai, N. *et al.* Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* **56**, 901–11 (2007).
48. Moral, R. *et al.* Diets high in corn oil or extra-virgin olive oil differentially modify the gene expression profile of the mammary gland and influence experimental breast cancer susceptibility. *Eur. J. Nutr.* **55**, 1397–409 (2016).
49. Rogue, A., Spire, C., Brun, M., Claude, N. & Guillouzo, A. Gene Expression Changes Induced by PPAR Gamma Agonists in Animal and Human Liver. *PPAR Res.* **2010**, 325183 (2010).
50. García-García, M. R. & Martínez-López, E. De Hipócrates a la genómica nutricional: Interacción genes-ácidos grasos. *Rev. Endocrinol. y Nutr.* **21**, 23–2013
51. Ordovas J, *et al.* Nutrigenetics, Plasma Lipids, and Cardiovascular Risk. *J. Am. Diet. Assoc.* **106**, 1074–1081 (2006).
52. Sabharwal, S. S. & Schumacker, P. T. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nat. Rev. Cancer* **14**, 709–721 (2014).
53. Shidara, Y. *et al.* Positive contribution of pathogenic mutations in the mitochondrial genome to the promotion of cancer by prevention from apoptosis. *Cancer Res.* **65**, 1655–63 (2005).
54. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
55. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
56. Kim, S., Lee, Y. & Koo, J. S. Differential expression of lipid metabolism-related proteins in different breast cancer subtypes. *PLoS One* **10**, 1–15 (2015).

57. Powell, C. A. *et al.* Fatty acid binding protein 5 promotes metastatic potential of triple negative breast cancer cells through enhancing epidermal growth factor receptor stability. *Oncotarget* **6**, (2015).
58. Kridel, S. J., Axelrod, F., Rozenkrantz, N. & Smith, J. W. Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Res.* **64**, 2070–5 (2004).
59. Vazquez-Martin, A., Roperio, S., Brunet, J., Colomer, R. & Menendez, J. A. Inhibition of Fatty Acid Synthase (FASN) synergistically enhances the efficacy of 5-fluorouracil in breast carcinoma cells. *Oncol. Rep.* **18**, 973–980 (2007).
60. Jones, R. G. & Thompson, C. B. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev.* **23**, 537–48 (2009).
61. Choi, J. *et al.* Metabolic interaction between cancer cells and stromal cells according to breast cancer molecular subtype. *Breast Cancer Res.* **15**, R78 (2013).
62. Kim, S., Kim, D. H., Jung, W. H. & Koo, J. S. Metabolic phenotypes in triple-negative breast cancer. *Tumor Biol.* **34**, 1699–1712 (2013).
63. Zong, W. X., Rabinowitz, J. D. & White, E. Mitochondria and Cancer. *Mol. Cell* **61**, 667–676 (2016).
64. Weinberg, F. *et al.* Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 8788–93 (2010).
65. Sotgia, F. *et al.* Mitochondria ‘fuel’ breast cancer metabolism: Fifteen markers of mitochondrial biogenesis label epithelial cancer cells, but are excluded from adjacent stromal cells. *Cell Cycle* **11**, 4390–4401 (2012).
66. Lehmann, B. D. *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J. Clin. Invest.* **121**, 2750–67 (2011).
67. Uscanga-Perales, G. I., Santuario-Facio, S. K. & Ortiz-López, R. Triple negative breast cancer: Deciphering the biology and heterogeneity. *Med. Univ.* **18**, 105–114 (2016).
68. Santuario-Facio Sandra Karina. Identificación de vías de señalización afectadas en pacientes con cáncer de mama mediante perfiles de expresión global y secuenciación masiva. (UANL, 2014).
69. Reeves, R. & Beckerbauer, L. HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* **1519**, 13–29 (2001).
70. Fusco, A. & Fedele, M. Roles of HMGA proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 899–910 (2007).
71. Liu, W. M., Guerra-Vladusic, F. K., Kurakata, S., Lupu, R. & Kohwi-Shigematsu, T. HMG-I(Y) recognizes base-unpairing regions of matrix attachment sequences and its increased expression is directly linked to metastatic breast cancer phenotype. *Cancer Res.* **59**, 5695–703 (1999).
72. Brunetti, a, Manfioletti, G., Chiefari, E., Goldfine, I. D. & Foti, D. Transcriptional regulation of human insulin receptor gene by the high-mobility group protein HMGI(Y). *FASEB J.* **15**, 492–500 (2001).
73. Foti, D. *et al.* Lack of the architectural factor HMGA1 causes insulin resistance and diabetes in humans and mice. *Nat. Med.* **11**, 765–773 (2005).
74. Fedele, M. *et al.* Role of the high mobility group A proteins in human lipomas. *Carcinogenesis* **22**, 1583–91 (2001).

75. Jung, Y. Y. *et al.* Expression of Lipid Metabolism-Related Proteins in Metastatic Breast Cancer. *PLoS One* **10**, e0137204 (2015).
76. Jin, Q. *et al.* Fatty acid synthase phosphorylation: a novel therapeutic target in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* **12**, R96 (2010).
77. Viñas, G. *et al.* Fatty Acid Synthase (FASN) expression in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res.* **72**, P4-9-11-P4-09–11 (2012).
78. Liberti, M. V. & Locasale, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem. Sci.* **41**, 211–218 (2016).
79. Lisanti, M. P. & Sotgia, F. Mitochondrial oxidative stress in cancer associated fibroblasts drives lactate production, promoting breast cancer tumor growth. *Cell Cycle* **1023**, 4065–4073 (2011).
80. Owens, K. M., Kulawiec, M., Desouki, M. M., Vanniarajan, A. & Singh, K. K. Impaired OXPHOS complex III in breast cancer. *PLoS One* **6**, e23846 (2011).
81. Adélaïde, J. *et al.* Integrated profiling of basal and luminal breast cancers. *Cancer Res.* **67**, 11565–75 (2007).
82. Zuo, J. *et al.* Hypoxia promotes the invasion and metastasis of laryngeal cancer cells via EMT. *Med Oncol* **33**, 15 (2016).
83. Wilcox, R. in *Encyclopedia of Biostatistics* (John Wiley & Sons, Ltd, 2005). doi:10.1002/0470011815.b2a15064
84. Fedele, M. & Fusco, A. HMGA and Cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1799**, 48–54 (2010).
85. Di Cello, F., Shin, J., Harbom, K. & Brayton, C. Knockdown of HMGA1 inhibits human breast cancer cell growth and metastasis in immunodeficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **434**, 70–4 (2013).
86. Maurizio, E. *et al.* Translating Proteomic Into Functional Data: An High Mobility Group A1 (HMGA1) Proteomic Signature Has Prognostic Value in Breast Cancer. *Mol. Cell. Proteomics* **15**, 109–23 (2016).
87. Wang, G. *et al.* PAK1 regulates RUFY3-mediated gastric cancer cell migration and invasion. *Cell Death Dis.* **6**, e1682 (2015).
88. Leone, J. P. *et al.* Breast cancer brain metastases: the last frontier. *Exp. Hematol. Oncol.* **4**, 33 (2015).
89. Ocaña, O. H. *et al.* Metastatic Colonization Requires the Repression of the Epithelial-Mesenchymal Transition Inducer Prrx1. *Cancer Cell* **22**, 709–724 (2012).
90. Wang, X. *et al.* Responses of the Insulin Signaling Pathways in the Brown Adipose Tissue of Rats following Cold Exposure. *PLoS One* **9**, e99772 (2014).
91. Bradley, E. W., Ruan, M. M. & Oursler, M. J. PAK1 is a novel MEK-independent raf target controlling expression of the IAP survivin in M-CSF-mediated osteoclast survival. *J. Cell. Physiol.* **217**, 752–8 (2008).